

Polyacrylamid-Gelelektrophorese
von Proteingemischen:
Ein Gerät zur elektrophoretischen Elution
einzelner Proteinbanden aus dem Gel

von
Rainer Hofmann
aus
Nürnberg

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Universität Erlangen-Nürnberg

Vorstand: Professor Dr. W. Kersten

**Polyacrylamid-Gelelektrophorese
von Proteingemischen:
Ein Gerät zur elektrophoretischen Elution
einzelner Proteinbanden aus dem Gel**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Rainer Hofmann
aus
Nürnberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten
Referent: Prof. Dr. H.-J. Horstmann
Korreferent: Prof. Dr. W. Kersten
Tag der mündlichen Prüfung: 08.05.1980

1. Die Eltern

2. Die Kinder

3. Die Großeltern

4. Die Verwandten

5. Die Freunde

6. Die Lehrer

7. Die Mitsprache

8. Die Entscheidung

9. Die Verantwortung

Meinen Eltern

10. Die Eltern

11. Die Kinder

12. Die Großeltern

13. Die Verwandten

14. Die Freunde

15. Die Lehrer

16. Die Mitsprache

17. Die Entscheidung

18. Die Verantwortung

19. Die Eltern

20. Die Kinder

21. Die Großeltern

22. Die Verwandten

23. Die Freunde

24. Die Lehrer

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	1
B. Experimenteller Teil	3
1. Membranproteine	3
1.1 Einteilung der Membranproteine nach ihren Eigenschaften	3
1.2 Kurze Charakterisierung der Membranproteine	4
2. SDS-Gelelektrophorese - Prinzip	7
3. Wahl der Gelbedingungen	8
4. Wahl des geeigneten Puffersystems für die Elektrophorese	10
5. Elektrophorese - praktische Durchführung	12
6. Entwicklung einer Methode der elektrophoretischen Elution von Proteinen	14
6.1 Prinzip und mögliche Verfahren	14
6.2 Vorversuche- Konstruktion eines Gerätes zur elektrophoretischen Elution	17
6.3 Konstruktion eines Gerätes zur elektrophoretischen Elution von Proteinen	20
6.4 Eigenschaften der Dialysiermembran	25
6.5 Optimierung der Methode	28
6.5.1 Einpolymerisierung von Gelstücken in das Elutionsrohr	28
6.5.2 Prüfung verschiedener Puffersysteme zur elektrophoretischen Elution	31
6.5.3 Versuche zur Steigerung der Proteinkonzentration im Eluat	37
6.5.4 Optimierung der Bedingungen für Zeit, Spannung und Stromstärke während der elektrophoretischen Elution	40

6.6 Praktische Handhabung des entwickelten Gerätes zur elektrophoretischen Elution	44
7. Anwendung des Verfahrens der elektrophoretischen Elution von Protein	48
7.1 Elektrophoretische Elution verschiedener Proteine	48
7.2 Trennung der Bande 8 von Glykophorin im Gel	49
7.3 Gewinnung des Band-3-Proteins	53
7.4 Prüfung, ob Band-3-Protein nach längerer Zeit aggregiert	54
8. Kurze Charakterisierung von Band-3-Protein	56
9. Enzymatische Spaltung von Band-3-Protein	58
9.1 Praktische Durchführung der partiellen enzymatischen Hydrolyse	58
9.2 Substratspezifität und Eigenschaften der verwendeten Enzyme	61
9.3 SDS-PAGE der enzymatischen Spaltprodukte von Band-3-Protein	63
9.4 Färbung des Gelgradienten	65
9.5 Auswertung der Versuche der partiellen enzymatischen Hydrolyse von Band-3-Protein in Flachbettgelen	66
9.6 Herstellung der Flachbettgele zur SDS-PAGE der enzymatischen Spaltprodukte	72
10. Material und Methoden	74
10.1 Chemikalien und Geräte	74
10.2 Präparation der Erythrozytenmembran	75
10.3 Lösen der Membranen	77
10.4 Messung der Ausbeute an elektrophoretisch eluiertem Protein	78
10.5 Fluoreszenzfärbung der Proteine	80
10.6 Färbemethoden	81
11. Schematische Übersicht über die Behandlung der ghosts	85
C. Diskussion	86
D. Zusammenfassung	90
E. Literaturverzeichnis	92

In der Arbeit verwendete Abkürzungen:

Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EWP	Erythrozytenwaschpuffer
GWP	Ghostwaschpuffer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Perjodat-Schiff-Reaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

A. Einleitung

Bei der Betrachtung der Zellbiologie und -pathologie wurden bei früheren Untersuchungen hauptsächlich Strukturen innerhalb der Zelle für das physiologische Verhalten bzw. für eine Änderung der Eigenschaften der Zelle verantwortlich gemacht. Die Zellmembran sah man lediglich als Hülle und Grenze zwischen zwei Systemen an, ohne die funktionelle Bedeutung der Membran als ein Mosaik aus den verschiedensten Unter-einheiten zu erkennen. Erst in den letzten Jahren sah man die Relevanz der Membran einer Zelle und versucht nun die vielfältigen Eigenschaften der Zellmembran in Einklang miteinander zu bringen.

So erweist sich die Zellmembran als Ort der Zellerkennung, als Bindungsort für Bakterien, Viren, Pharmaka, Hormone, Antikörper, Toxine und Antigene. Das Bild einer einfachen Permeabilitätsschranke zwischen Zellinnerem und Zellumgebung ist einer Betrachtung der Membran als Schaltstelle, als Mediator bei der Umwandlung extrazellulärer in intrazelluläre Signale gewichen.

Menschliche Erythrocyten sind bevorzugte Objekte für Membranuntersuchungen, da sie leicht und in ausreichender Menge gewonnen werden können. Die Membranhüllen (ghosts) weisen die gleichen morphologischen Eigenschaften und vielfach die gleichen Permeabilitätscharakteristika wie intakte Erythrocyten auf. Bei der biochemischen Untersuchung der Membrankomponenten, insbesondere der Proteine, ergibt sich bei der bisherigen Forschung immer die Schwierigkeit, die einzelnen Proteine der Membran selektiv zu isolieren. Eine gute Auftrennung der Proteine in reproduzierbare Bandenmuster war durch verschiedenste Verfahren der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) bereits

gelingen, doch erschöpfen sich die Ergebnisse in einer Beschreibung der verschiedensten Proteinbanden und -fleckenkonstellationen. Mit der Polyacrylamid-Gelelektrophorese lassen sich Komplexität oder Reinheit von Proteinlösungen gut nachweisen. Vielfach ist es jedoch notwendig, über die analytische Stufe hinaus zu versuchen, einzelne spezifische Proteinbanden aus dem Gel zu gewinnen.

Die Darstellung einzelner Proteine der Erythrocytenmembran war durch Säulenchromatographie gelungen; vielfach ergaben sich jedoch Verunreinigungen mit anderen Proteinen ähnlichen Lösungsverhaltens.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zu finden, Bestandteile aus komplexen Proteingemischen selektiv zu erhalten. Die Proteine sollten rein darstellbar sein und in hoher Konzentration in der Lösung vorliegen.

Bei der Entwicklung einer Methode der elektrophoretischen Elution aus einem Gelstück in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS) wurde stets darauf geachtet, daß die technische Durchführung einfach und zeitsparend ist. Untersuchungsobjekt für das Verfahren war die Erythrocytenmembran des Menschen, doch sollte die Methode für alle Proteine anwendbar sein, wobei in dieser Arbeit die elektrophoretische Elution von Albumin, Cytochrom C und Insulin ebenfalls untersucht wurde.

B. Experimenteller Teil

1. Membranproteine

1.1 Einteilung der Membranproteine nach ihren Eigenschaften

Erythrocytenmembranen von Säugetieren und Menschen kann man wegen ihrer einfachen Gewinnbarkeit, ihrer guten und schnellen Darstellung leicht als Objekt für die Testung neuer Methoden in der Biochemie verwenden. Gelöste Erythrocytenmembranen stellen ein komplexes Proteingemisch dar. Wegen ihrer guten Darstellbarkeit in spezifische Bandenmuster in der SDS-PAGE wurde die Erythrocytenmembran als Beispiel eines Proteingemisches für die Entwicklung eines Gerätes zur elektrophoretischen Elution von Proteinbanden aus einem Gel verwendet.

Die wasserfreie Erythrocytenmembran besteht zu 49,2 % aus Proteinen und zu 43,6 % aus Lipiden, wobei Phospholipide weitaus überwiegen. An Glykoproteine und Glykolipide gebundene Kohlenhydrate liefern 7,2 % des Trockengewichtes. (1).

Die Membranlipide (2 - 5) zeigen ein amphipathes Lösungsverhalten und bilden somit eine Lipiddoppelschicht (bilayer). Die Proteine der Zellmembran sind in diese Lipidschicht eingelagert (integrierte oder intrinsische Proteine) oder oberflächlich (periphere oder extrinsische Membranproteine) (6).

Bei der Erythrocytenmembran liegen etwa 30 - 35 % der Proteine als periphere Proteine vor (7). Sie sind nur locker, meist an die Innenseite der Membran über Ionenbindungen angelagert und können daher mit Pufferlösungen niedriger Ionenstärke abgelöst werden.

Etwa 65 - 70 % der Membranproteine sind in die Lipiddoppelmembran integriert. Diese Proteine durchziehen die Membran meist ein- oder mehrmals. Sie besitzen apolare

Regionen, über die sie durch hydrophobe Wechselwirkungen zu den Lipiden und anderen Proteinen im Membrankontinuum verankert sind. Daher sind diese integrierten Membranproteine erst nach Zerstörung der Membranstruktur in Lösung zu bringen.

1.2 Kurze Charakterisierung der Membranproteine

Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen der Erythrocytenmembran in Anwesenheit von SDS lassen sich bis zu 25 (8) gut voneinander trennbare Proteinbanden mit Coomassieblau und 4 große Glykoproteinbanden in der PAS-Färbung nachweisen. Sechs Proteinhauptbanden, bezeichnet mit I-VI und vier Glykoproteinbanden - PAS 1-4 machen 60-70 % der Gesamtproteinmenge der Membran aus (7).

Abbildung Nr.1 und Tabelle Nr. 1 geben einen kurzen Überblick über die Haupt-Proteine der menschlichen Erythrocytenmembran.

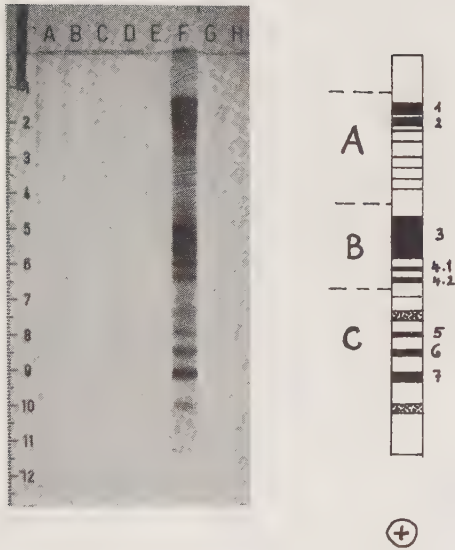


Abb 1 : SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Proteine der menschlichen Erythrozytenmembran. Schematische Übersicht über die Hauptproteinbanden bei der Coomassieblau-Färbung. Auf das Gel wurden 100 μ g Protein aufgetragen. Bedingungen der Elektrophorese siehe S.8. Bezeichnung der Banden nach Fairbanks(7).

Bezeichnung der Bande in der SDS- PAGE	Einteilung der Proteine	peripher	Molekular- gewicht	Funktion-Bemerkungen	Literatur
1	Spektrin 1		250000	an der inneren Membran- oberfläche gelegen	(9)
2	Spektrin 2		220000	leicht ablösbar zusammen mit Aktin Bildung eines Aktomyosin-ähnlichen Netzwerkes	(10) (11)
3	"Band-3- Protein"		98000- 118000	heterogen durchzieht die Membran Assoziation mit Aldolase Assoziation mit Glycerin-3- phosphatdehydrogenase Assoziation mit Cholesterin Anionentransport Monosaccharidtransport Wassertransport	(8,75) (12,13) (14,15) (16) (17) (18-20) (21,22) (23)
	Glycophorin		30000 (Monomer)	durchzieht Membran aus Untereinheiten Untereinheit: Glykophorin A Synonyme: PAS 1 und 2 NM-Glykoprotein Sialoglykoprotein	(24,25) (26) (27) (28)
4.1	Band 4.1		88000	Assoziation mit Band-3	(12)
4.2	Band 4.2		80000	an der Innenseite der Membran	(12)
5	Aktin		47000	Assoziation mit Spektrin	(11,29)
6	Glycerinal- dehyd-3-phosphat- dehydrogenase		39500	Assoziation mit Band-3- Protein	(16)
7	Band-7- Protein				(30,31)

alle 1: Hauptproteine der menschlichen Erythrocytenmembran

2. SDS-Gelelektrophorese-Prinzip

Zur Trennung von Proteinen mit hoher Trennschärfe eignet sich die Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Hierbei werden die Proteine nach ihrer Nettoladung, ihrer Form und der Molekülgröße in einem elektrischen Feld getrennt. Durch Änderung der Konzentration und des Vernetzungsgrades des Gels lassen sich die Wanderungsbedingungen beeinflussen. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist dabei eine besondere Form des allgemeinen Prinzips der Elektrophorese mit Polyacrylamid als Trägergel. Durch Zugabe von SDS zu Membranproteinen kann zum einen eine vollständige Lösung der Proteine erreicht werden, da die Membranarchitektur aufgelöst wird (32) und damit alle Protein-Protein- und Protein-Lipid-Wechselwirkungen aufgehoben werden, zum anderen lagert sich SDS an die Proteine an (33). Die Proteine tragen durch Bildung von Komplexen zwischen SDS und den Proteinen nach außen die Ladung des Detergens. Dadurch wird die Eigenladung der Proteine aufgehoben und es resultiert eine einheitlich negative Ladung. Damit entfallen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese die Trennparameter Nettoladung und Molekülform. Im elektrischen Feld werden die SDS-Protein-Komplexe ausschließlich nach ihrer Molekülgröße voneinander getrennt.

Somit kann die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese als Trennverfahren für die Membranproteine des Erythrocyten angewandt werden (34-39). Vorteil des Verfahrens ist die hohe Trennschärfe, doch ist das Auflösungsvermögen nur nach Molekülgröße beschränkt. Geringe Unterschiede bei den Molekulargewichten einzelner Proteine führen in der SDS-PAGE zur Überlagerung und zu einer scheinbar einheitlichen Protein-

bande. Außerdem können schwächer mit Coomassie-blau angefärbte Banden gegenüber intensiv gefärbten "verschwinden". Da Detergentien wie SDS die Sekundärstruktur von Proteinen zerstören, sind diese bei Verunreinigungen der Membranlösungen mit Proteasen für eine enzymatische Peptidolyse besonders empfindlich (7).

3. Wahl der Gelbedingungen

Band-3-Protein und Glykophorin zeigen in der SDS-PAGE nahezu identisches Wanderungsverhalten. Um eine möglichst gute Trennung zwischen diesen beiden Proteinen zu erreichen, wurde versucht, einige Parameter des Gel-systems zu verändern.

Hjerten (40) hat für die Beschreibung eines Gels die Bezeichnungen T und C eingeführt.

$$T = \frac{a + b}{V} \cdot 100 (\%) \qquad C = \frac{b}{a + b} \cdot 100 (\%)$$

a: Gewicht an Acrylamid (in Gramm)

b: Gewicht an Bisacrylamid (in Gramm)

V: Lösungsvolumen (in ml)

Für die Trennung der Membranproteine wurden verschiedene Geldichten mit C= 2% und T von 5,5% bis 7,5% erprobt. Als günstigstes System erwies sich T= 7,5% und C= 2%. Besonders im Bereich der Bande B tritt bei einem dichteren Gel wie bei T= 7,5% eine bessere räumliche Trennung der Einzelkomponenten auf, da geringe Unterschiede in den Molekulargewichten bei einem dichteren Gel deutlicher sichtbar werden.

Als Puffer wurden im Trenngel einmal Natriumphosphat pH 7,1, ein andermal Tris-Cl pH 8,9 (41) verwendet.

Da man das Tris-Cl-System mit einem größeren Volumen an Probenlösung bei besserer Trennschärfe gegenüber dem Phosphatsystem beladen kann, wurde diesem System der Vorzug gegeben.

Die Gele hatten folgende Zusammensetzung:

400 mM Tris-Cl pH 8,9

0,15% SDS

T= 7,5%

C= 2%

Die Konzentration an Persulfat und TEMED wurde so gewählt, daß die eingesetzte Menge eine Polymerisation der Gellösung innerhalb von 40 Minuten bei Zimmertemperatur bewirkt.

Zur Herstellung von 12 Gelen benötigt man folgende Gellösung:

3 ml 2% Bisacrylamid

7,3ml 40% Acrylamid

16ml 1M Tris-Cl pH 8,9

0,3ml 20% SDS

1,2ml 1,5% Persulfat

H₂O bidest ad 39,2ml

Nach dem Mischen und Evakuieren der Lösung mit einer

Wasserstrahlpumpe werden 0,8 ml 1 % TEMED unter Rühren zugegeben.

Die Gellösung wird anschließend in die mit Chromschwefelsäure gereinigten Glasröhrchen (13 x 0,5 cm) 11cm hoch eingefüllt. Die Gellösung wird dann zur Bildung einer glatten Oberfläche mit 1-2 ml Wasser überschichtet und mindestens 12 Stunden erschütterungsfrei stehen gelassen. Nach der Polymerisation wird die Wasserschicht abgossen und die Gele für die Elektrophorese vorbereitet. Die Gele können aber auch mit dem Gelpuffer (0,15 ml 20 % SDS und 8 ml 1M Tris-Cl pH 8,9 ad 20 ml H₂O bidest) überschichtet werden und so etwa 8 - 14 Tage aufbewahrt werden.

Die Lösungen von Ammoniumpersulfat und TEMED müssen für die Gelherstellung jeweils unmittelbar vor Zugabe zur Gellösung frisch hergestellt werden. Acrylamid- und Bisacrylamidlösungen können bis zu drei Wochen in dunklen Flaschen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

4. Wahl des geeigneten Puffersystems für die Elektrophorese

Ein weiterer Parameter, der das Wanderungsverhalten der Membranproteine beeinflusst, ist der Elektrodenpuffer. Es wurde ein nach Weber und Osborne (42) modifiziertes kontinuierliches Phosphatsystem, das Tris-Glycin-System nach Lämmli (41) und vier weitere Puffersysteme nach Neville (43,44) erprobt. Tabelle Nr.2 gibt eine schematische Übersicht über die Puffersysteme.

Oberpuffer	1. 50mM Na-phosphat pH 7,1 0,1% SDS	2. 25mM Na-phosphat pH 7,1 0,1% SDS	3. 10mM Na-phosphat pH 7,1 0,1% SDS	4. 25mM Tris 192mM Glycin pH 7,1 0,1% SDS
	Unterpuffer	50mM Na-phosphat pH 7,1 0,1% SDS	10mM Na-phosphat pH 7,1 0,1% SDS	25mM Tris 192mM Glycin pH 8,9 0,1% SDS

Oberpuffer	5. 40mM Borat 41mM Tris pH 8,64 0,1% SDS	6. 40mM Borat 41mM Tris pH 8,64 0,1% SDS	7. 40mM Borat 41mM Tris pH 8,64 0,1% SDS	8. 40mM Borat 41mM Tris pH 8,64 0,1% SDS	10. 40mM Borat 41mM Tris pH 8,64 0,1% SDS
	Unterpuffer	40mM Borat 41mM Tris pH 8,64 0,1% SDS	0,0954 M HCl 0,0954 M Tris pH 5,77	0,049 M HCl 0,1716M Tris pH 8,47	0,0308 M HCl 0,4244 M Tris pH 9,18

Tabelle 2: Puffersysteme für die Elektrophorese

Als geeignet erwiesen sich zwei Systeme (Nr.4 und 8), doch wurde das System Nr.8 gewählt:

Oberpuffer : 40 mM Borat / 41 mM Tris pH 8,64 ; 0,1%SDS

Unterpuffer: 0,0308 M HCl/ 0,4244 M Tris pH 9,18; kein SDS

Das Tris-Glycin-System war wegen des Glycinegehaltes für die nachfolgende elektrophoretische Elution mit anschließender Proteinbestimmung ungeeignet (siehe dort).

Das Tris-Borat-System erwies sich als besonders geeignet, da bei diesem Puffersystem eine weite Trennung der Proteinbanden ab dem B-Bereich eintritt. (Zur Bezeichnung der Bereiche siehe Abb. 1). So nimmt der B- und der C-Bereich des Proteinmusters 2/3 bis 3/4 der Länge des Gelstäbchens ein, während der Abschnitt A nur einen kleinen Teil beansprucht. Man kann somit durch Wahl dieses Puffersystems bei guter Trennschärfe vor allem im Bereich der Bande B und der nachfolgenden Banden eine maximale Trennung der Proteinbanden im Gel erreichen.

5. Elektrophorese - praktische Durchführung

Nach Abschleudern des Gelpuffers und mehrmaligem Spülen der Geloberfläche mit Oberpuffer wird die Probenlösung mit einer Kolbenhubpipette auf die Geloberfläche aufgebracht. Anschließend wird mit Hilfe einer Schlauchpumpe (LKB, Perpex) vorsichtig Oberpuffer überschichtet. Eine andere Möglichkeit der Probenauftragung besteht darin, daß man mit einer Pipette das Probenvolumen dem Oberpuffer unterschichtet. Wichtig ist bei beiden Methoden, daß eine Verwirbelung der Probenlösung im Oberpuffer vermieden wird, da dies zu einer ungleichmäßigen Einwanderung des Proteins in das Gel oder gar zu einem Verlust an Material führen würde. Das auf das Gel aufgeschichtete Probenvolumen kann beim Tris-Cl-Gelsystem bis zu 150 µl betragen; beim Phosphatsystem

muß dieses Volumen kleiner als 100 μ l sein.

Nach dem Aufbringen der Probe wird das Röhrchen vorsichtig in die Elektrophoreseapparatur eingepaßt und die obere und untere Pufferkammer mit Pufferlösung gefüllt. Dabei wird für 10 Minuten eine Stromstärke von $I = 1$ mA pro Gelröhrchen, dann für 20 Minuten $I = 2$ mA pro Gelröhrchen und nach 30 Minuten die Endstromstärke $I = 3,5$ mA pro Gelrohr eingestellt. Die Elektrophorese-dauer mit konstanter Stromstärke beträgt bei Zimmertemperatur 3,5 Std. Die Spannung steigt während der Elektrophorese kontinuierlich an und erreicht am Ende einen Höchstwert von 150 - 160 Volt.

Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Gelstäbchen mit Hilfe einer langen dünnen Kanüle unter Vorspritzen mit Wasser aus dem Gelrohr entfernt und können weiter behandelt werden.

6. Entwicklung einer Methode der elektrophoretischen Elution von Proteinen

6.1 Prinzip und mögliche Verfahren

Bei der präparativen Gewinnung von Proteinen durch Gelelektrophorese bieten sich grundsätzlich zwei verschiedene Möglichkeiten an:

1. Eine kontinuierliche Elektrophorese ("Durchlauf-Elektrophorese") bis die Proteine auf Grund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit nacheinander am unteren Ende des Gels austreten.
2. Eine Elution der nach Abbruch der Elektrophorese noch im Gel liegenden, voneinander getrennten Proteine. Die Proteine müssen dabei vor der Elution im Gel lokalisiert werden, damit das Gelstück mit dem eingewanderten Protein ausgeschnitten werden kann.

Andere Verfahren der Proteingewinnung aus einem Gel neben der Elektrophorese bestehen in Extraktion (45), Homogenisieren des Gels (46), Elektrodialyse (47) oder Auflösen des Geles (48). Alle Verfahren ergeben eine große Verdünnung, eine Verunreinigung mit Gelbestandteilen und eine geringe Ausbeute an eluiertem Protein.

Ziel beider elektrophoretischer Methoden sollte es sein, das Protein selektiv und möglichst ohne weitere Verunreinigungen durch Gelbestandteile zu erhalten. Außerdem muß man eine hohe Ausbeute der eluierten Fraktion nach der Elution fordern, was durch Adsorption von Proteinen an Dialysiermembranen, an Geräteteile usw. oder durch eine starke Verdünnung der Proben nicht erreicht werden kann. Weiterhin ist eine möglichst kurze Elutionszeit wünschenswert.

Bei der ersten Technik, der "Durchlaufelektrophorese", werden die nacheinander aus dem Gel auswandernden Komponenten durch einen ständigen Pufferstrom abgeschwemmt und fraktioniert (45,49-54).Lewis und Clark (45) waren dabei die ersten, die die Disk-elektrophorese von Davis (55) und Ornstein (56) zu einer präparativen Methode modifizierten.

Nachteile dieser Technik sind: Apparaturen, die einen großen technischen Aufwand erfordern; eine starke Verdünnung der Komponenten in einem großen Puffervolumen; oftmals ein Vermischen der im Gel noch voneinander getrennten Proteinbanden, insbesondere wenn sie eng benachbart liegen; der Nachteil, daß sich die Apparatur während der Elution stark erhitzt und deshalb durch thermische Konvektion die Ausbeute an Protein im Puffervolumen abnimmt. Kühlungen der gesamten Apparatur sind versucht worden, was aber das Gerät noch weiter kompliziert.

Die Möglichkeit einer semikontinuierlichen Elution (159) ist ebenfalls beschrieben, doch zeigen sich hier dieselben schwerwiegenden Nachteile wie bei der kontinuierlichen Methode.

Die zweite Möglichkeit einer selektiven Gewinnung von Material aus einem Polyacrylamidgel besteht in der Technik der elektrophoretischen Elution aus einem Gelstück , das nur das zu gewinnende Protein enthält.(45,48,57-63,160). Im Gegensatz zur kontinuierlichen Elution aus einem Gelstäbchen ist bei dieser Technik die Elektrophoresedauer begrenzt. Die Proteine werden durch die SDS-PAGE voneinander getrennt und liegen im Gel, wo sie lokalisiert werden müssen. Anschließend wird das Gelstück mit dem gewünschten Protein aus dem Gelstäbchen herausgeschnitten.Aus dem herausgeschnittenen Gelstäbchen kann das Protein

bei einer elektrophoretischen Elution auswandern und wird dann aufgefangen. Das Protein ist hier also bereits mit einer anderen Methode aus einem Proteingemisch abgetrennt worden. Bei der kontinuierlichen Elution aus einem Gelstäbchen hingegen erfolgt die Auftrennung eines Proteingemisches und die anschließende Gewinnung der einzelnen Komponenten in einem Arbeitsgang.

Die Lokalisation des Proteins nach der SDS-PAGE erfolgt entweder durch Anfärben der Banden nach der Elektrophorese mit Coomassieblau, durch Anfärben von Randstreifen mit Coomassieblau, durch Vergleich mit gefärbten Referenzgelen, die unter gleichen Bedingungen elektrophorisiert wurden oder UV-Fluoreszenz (48, 57, 64).

Weitere Möglichkeiten einer schnellen Erkennung von Proteinen in präparativen Gelen bestehen in der Verwendung gefärbter Proteine (58) durch Oberflächenfluoreszenz mit Anilinonaphtalen-Sulfonat (65) oder durch Behandlung der Oberfläche mit Trichloressigsäure oder Perchlorsäure (66, 67).

Die Nachteile aller genannten Verfahren der Proteingewinnung aus einem Gel sind das große Endvolumen mit der Notwendigkeit anschließender Dialyse und Gefriertrocknung, meistens technisch aufwendige und schwierig zu handhabende Apparate, sowie eine lange Elutionsdauer (27 - 72 Stunden).

Um all diese Nachteile zu kompensieren, wurde versucht, eine Elutionsapparatur zu entwickeln. Man soll damit ein Protein, das sich in einem Gelstück befindet, mit möglichst unkompliziertem technischen Aufwand selektiv in einem kleinen Endvolumen elektrophoretisch eluieren können. Eine kurze Elutionsdauer mit hoher Ausbeute an Protein soll angestrebt werden.

6.2 Vorversuche - Konstruktion eines Gerätes zur elektrophoretischen Elution

Zur Untersuchung der Möglichkeiten einer elektrophoretischen Proteinelution aus einem Polyacrylamidgel wurde zunächst ein Vorversuchsmodell entwickelt (Abb.2).

Ein Glasrohr von 1 cm Durchmesser und 9 cm Höhe wurde hierbei durch ein Plastiknetz in eine kleinere untere Hälfte (Kammerendvolumen) und eine große obere Hälfte geteilt. Das Glasrohr selbst war dabei durch eine Gummidichtung in einem Pufferreservoir befestigt und tauchte mit dem unteren Ende ebenfalls in ein Pufferreservoir. Verschlussen wurde das Rohr nach unten mit einer Dialysiermembran, die durch einen Gummiring am Glasaußenrand fixiert war. Oberhalb des Netzes konnte das Gelstück aufgelegt werden, wobei das Protein bei der Elution durch das Netz hindurch bis zur Dialysiermembran eluiert wurde, von wo es anschließend abgesaugt werden konnte.

Zum Absaugen konnte entweder die Dialysiermembran von unten her mit einer Kanüle angestochen (57) oder durch einen dünnen Schlauch, der von oben durch das Netz bis zur Dialysiermembran geschoben wurde, das Kammerendvolumen abgesaugt werden. Die proteinhaltige Lösung wurde mit einer Spritze aspiriert. Der Schlauch wurde dabei in einer langen Kanüle, die einen etwas größeren Durchmesser als der Schlauch selbst hatte, vorsichtig bis zur Dialysiermembran vorgeschoben. Auch ein Einbringen des Schlauches in die richtige Lage bereits vor der Beladung des Glasrohres mit Gelstückchen und der Elution wurde versucht.

Alle Möglichkeiten erwiesen sich als ungeeignet, da sich das Protein nicht vollständig absaugen ließ und durch mechanische Irritation beim Absaugvorgang

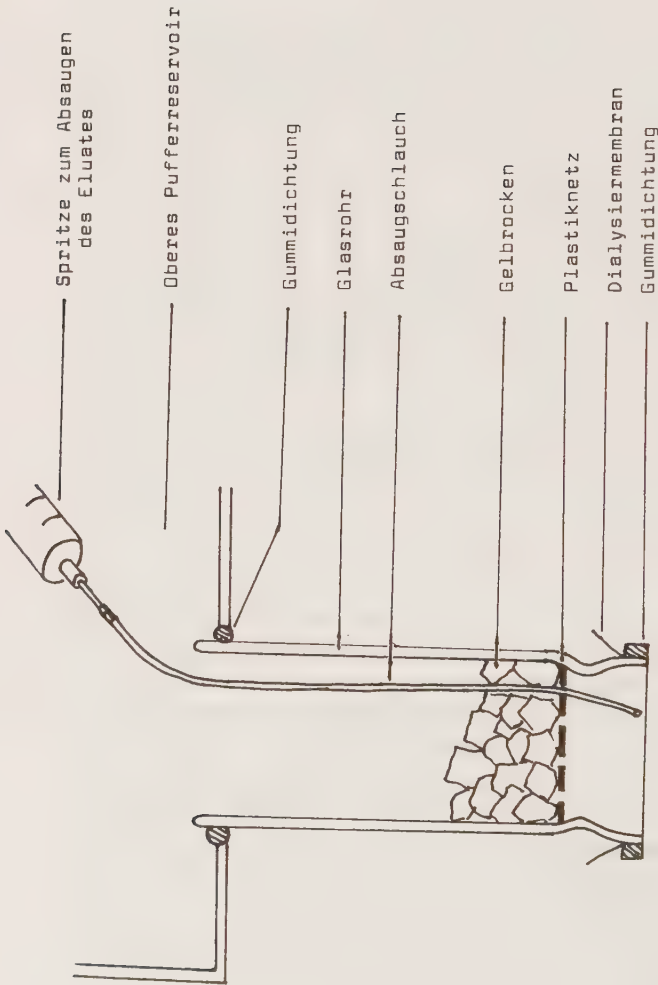


Abb.2: Modell zur elektrophoretischen Elution von Proteinen
(Vorversuche)

eine starke Verdünnung auftrat. Vielfach war die Proteinlösung aus Spalten und kleinen Vertiefungen der Dialysiermembran, die sich durch das Vorschieben des Schlauches gebildet hatten, nicht zu gewinnen. Auch ein ganz planes Abschleifen des Glasbodens und Spannen der Membran konnte die technischen Hindernisse nicht beseitigen. Ebenso waren die Bildung einer sackartigen Ausstülpung der Dialysiermembran vor der Elution, in der sich das Eluatprotein sammeln sollte oder das Abbinden des Dialysierschlauches mit Faden oder Gummi zur Bildung eines Säckchens nicht praktikabel.

Eine vollständige Abdichtung der Dialysiermembran mit einem Gummiband gelang in dem SDS-haltigen Unterpuffer auch nicht, da das Protein in Falten der Dialysiermembran nach außen dringen konnte. Eine Abdichtung des Glasbodens mit Fett konnte den Verlust an Material nicht beheben.

Als einfachste und am besten geeignete Form der Anode erwies sich eine lineare Anode. Sie war wegen der Gasentwicklung an der Anode seitlich der Elutionsröhre angebracht. Ringförmige Anoden unterhalb des Rohres oder eine in Höhe der unteren Kammer um das Elutionsrohr herumlaufende Anode wurden ebenso erprobt; sie erbrachten jedoch gegenüber einer linearen Elektrode keine Vorteile.

6.3 Konstruktion eines Gerätes zur elektrophoretischen Elution von Proteinen

Als Weiterentwicklung des Gerätes für die Vorversuche wurde eine Elutionsapparatur gebaut, die aus einem oberen und unteren Puffergefäß, sowie den Elutionsrohren zur Gewinnung des Proteins besteht (Abb.5).

Das Elutionsrohr ist aus Plexiglas (Innendurchmesser 1 cm, Außendurchmesser 2,3 cm, Höhe 2,5 cm) und trägt an seinem unteren Ende eine Kammer aufgeschraubt. Diese dient als Reservoir für das eluierte Protein (Abb.3 und 4).

Die Elutionskammer besteht aus einer äußeren Plexiglashalterung mit abgeflachtem Boden und einer Öffnung, die durch die Dialysiermembran verschlossen wird. Ein abgeflachter Boden erwies sich dabei als günstig, da er im unteren Pufferreservoir einen besseren Flüssigkeitsaustausch ermöglicht, als eine konisch zulaufende Spitze. In diesem Pufferkanal einer konischen Spitze erwärmt sich der Puffer und entgast. Die dabei unterhalb der Elutionskammer entstehenden Luftblasen stören die elektrophoretische Elution erheblich. Die Gasblasen im Pufferkanal konnten auch durch Rühren mit einem Magnetrührer im unteren Pufferreservoir oder mechanisch nicht entfernt werden.

In der Plexiglashalterung (1) liegen eine Teflonscheibe (2), die Dialysiermembran (3) sowie eine scheibenförmige Kammer (4) mit einem konisch zulaufenden Innenteil für das zu gewinnende Eluatvolumen. Alle Teile werden durch zwei Teflonschrauben miteinander verbunden. Auf den Kammerblock (4) wird anschließend ein Teflonnetz (5) aufgelegt und die Elutionskammer mit dem Elutionsrohr (6) fest verschraubt (siehe Abb.4).

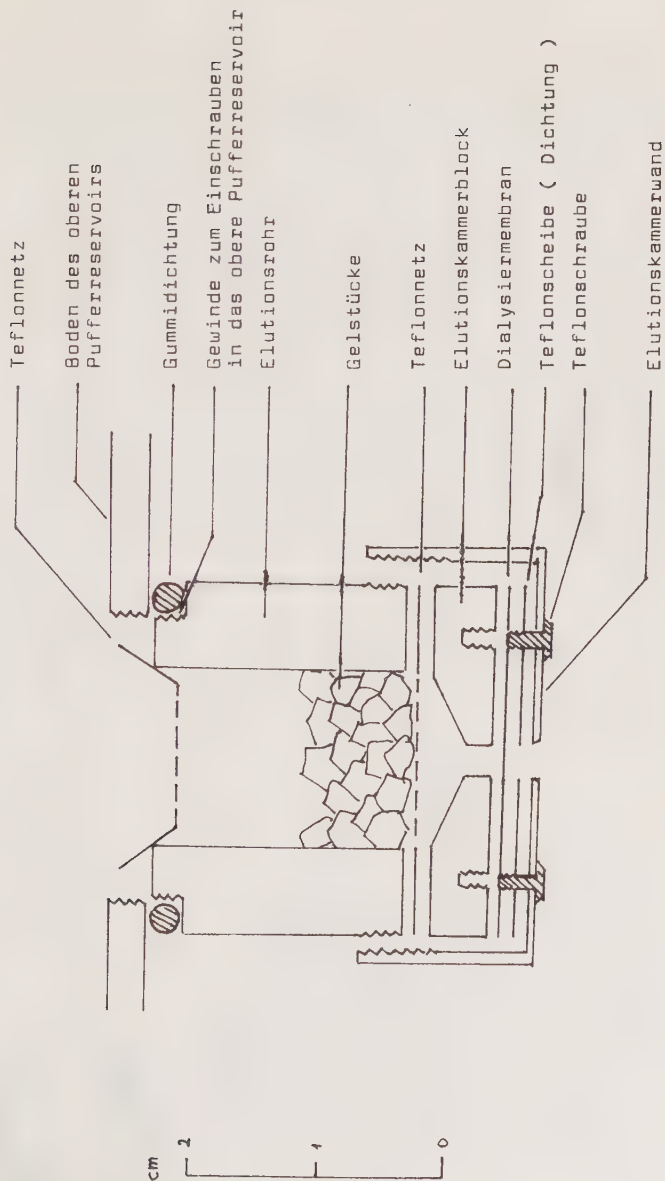


Abb.3 : Schematische Seitenansicht des Elutionsrohres

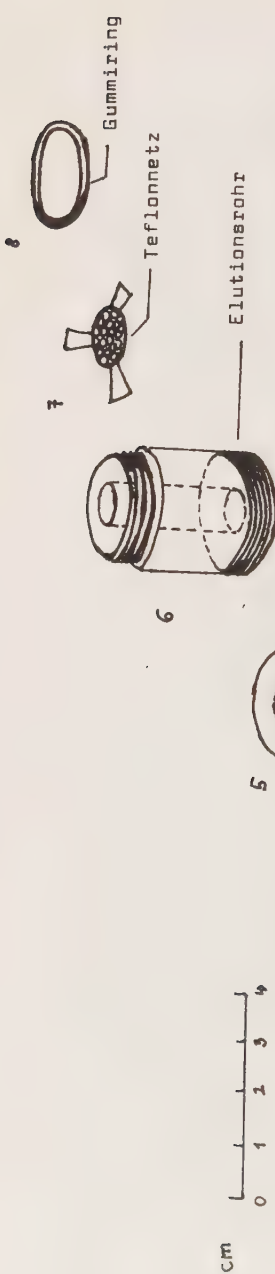


Abb.4: Einzelteile des Elutionsrohres

Nach der Elution kann der untere Teil, der durch die beiden von außen eingeführten Schrauben fest zusammenhält, wieder abgeschraubt werden und das eluierte Protein unter Sicht mit einer Pipette aus der Kammer abgesaugt werden.

Die Abdichtung der Elutionskammer gegenüber dem unteren Pufferreservoir erfolgt durch die scheibenförmige Dialysiermembran und durch das feste Verschrauben der Kammer mit dem Elutionsrohr, wobei die plastisch verformbare Teflonscheibe und der nicht perforierte Rand des Teflonnetzes für einen dichten Verschuß sorgen. Auf das Teflonnetz werden die mit einem Skalpell kleingeschnittenen Gelbrocken aufgelegt. Das Protein wird aus den Gelschnitzeln elektrophoretisch eluiert und vor der Dialysiermembran aufgefangen. Oberhalb der Gelschicht kann das Elutionsrohr mit einem elastischen Teflonnetz mit Falz (7) abgeschlossen werden. Es verhindert ein eventuelles Hochschwimmen der Gelbrocken in den Oberpuffer. Ein weiches Teflonnetz, das sich mit dem Falz ganz leicht in das Elutionsrohr hineinspreizt, ist einfacher zu handhaben, als eine mit Puffer äquilibrierte Glaswollschicht.

Die Dialysiermembran besteht aus einer runden Scheibe, die aus einem Visking-Dialysierschlauch (36/32, Ø 38 mm, Breite 44 mm, Wandstärke 0,025 mm) hergestellt wird. Dabei schneidet man mit einem Korkbohrer aus dem Schlauch eine Scheibe von 2,3 cm Durchmesser. In diese Scheibe werden seitlich zwei Löcher eingestanz, die später für den Durchtritt der Teflonschrauben dienen. Vor der Benutzung wird die Dialysiermembran in Wasser eingeweicht.

Die Elutionsapparatur besteht aus einem oberen und

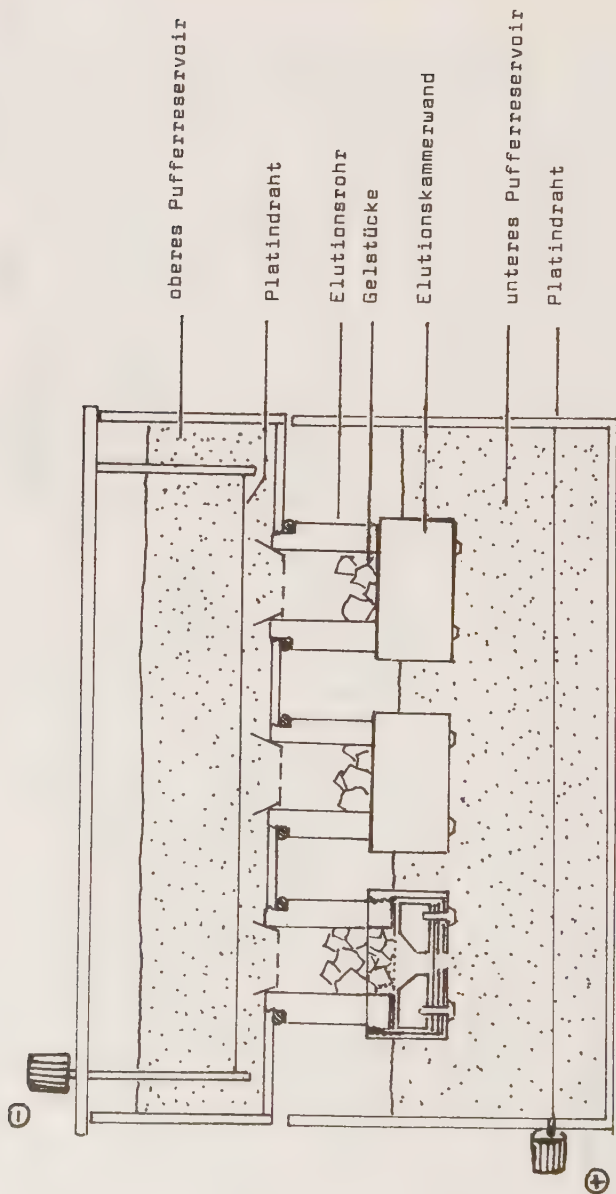


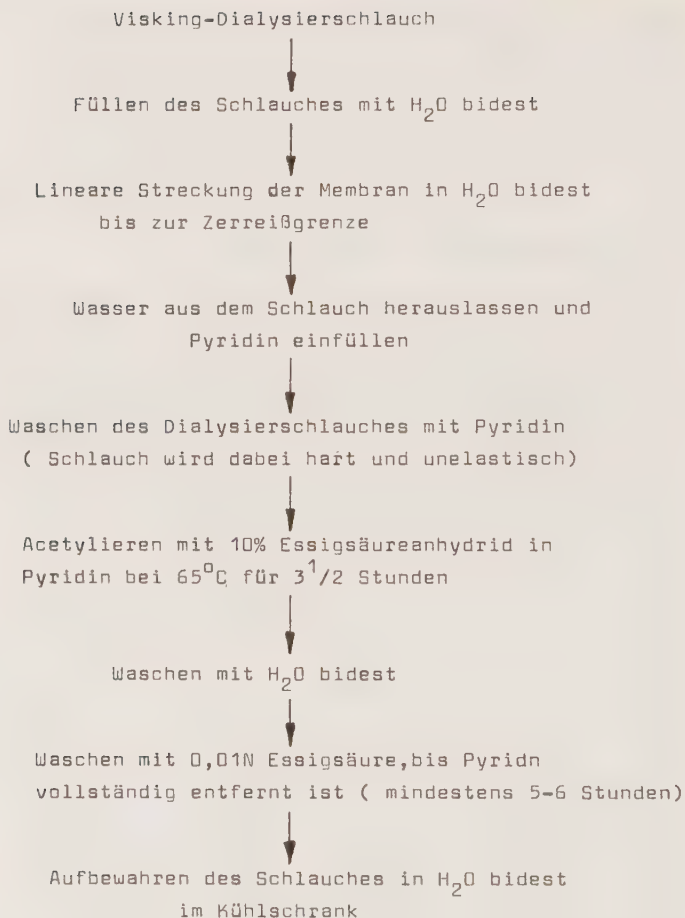
Abb.5: Schematische Seitenansicht der Elutionsapparatur

unteren Plexiglasgefäß. In das obere Pufferreservoir lassen sich jeweils drei Elutionsrohre mit einem Gewinde einschrauben, das mit einem Gummiring abgedichtet wird. Die obere Platinelektrode ist Teil der Gefäßabdeckung, während die untere Anode in der Wand des unteren Pufferreservoirs befestigt ist. (Abb.5)

6.4 Eigenschaften der Dialysiermembran

Zur Bestimmung der Porosität der verwendeten Dialysiermembran -(Visking 36/32, Durchmesser 38 mm, Breite 44mm, Wandstärke 0,025 mm, Katalognummer 44120) - wurden zur elektrophoretischen Elution Substanzen verschiedenen Molekulargewichtes verwendet. Cytochrom C (MG 12500), Insulin B als Einzelkette (MG 3400), sowie Insulin als Doppelkette (MG 6800) wurden untersucht.

50 µg Cytochrom C gelöst in 25 µl 1M Tris-Cl pH 8,9 wurden mit Inkubationslösung (siehe S.77) und Glycerin versetzt und anschließend einer SDS-PAGE, sowie nachfolgender elektrophoretischer Elution aus einem Gel unterworfen. Cytochrom C braucht nicht markiert zu werden, da es durch seine rötliche Eigenfarbe im Gel erkannt werden konnte. Insulin wurde mit Fluran markiert (siehe S.80) und bei Verwendung als Einzelkette zusätzlich mit β-mercaptoäthanol versetzt, um Disulfidbrücken aufzulösen. Insulin als Doppelkette wurde lediglich mit Glycin, SDS sowie Tris-Cl-Puffer versetzt und anschließend einer SDS-PAGE unterworfen. Zur Erzielung einer möglichen Steigerung der Ausbeute an eluiertem Protein wurde die Cellophan-Dialysiermembran nach Craig (68,69) vorbehandelt. Dadurch soll eine Änderung der Porenweite erreicht werden. Nachfolgendes Schema gibt einen kurzen Überblick über die Behandlung der Membran zur Modifikation der Porenweite.



Das Prinzip der Porositätsänderung beruht darauf, daß durch Streckung der Membran die vorher runden Poren zu Ovalen verformt werden, wobei die ovalen Lumina anschließend bei der Acetylierung von Acetylresten besetzt werden und somit zusätzlich eine Verschmälerung eintritt. Eine Verengung der Poren kann sowohl durch Streckung der Membran wie durch Acetylierung alleine erreicht werden, doch die Kombination beider Verfahren ergibt eine maximale Porenverschmälerung. Die so modifizierte Dialysiermembran kann für mehrere Wochen im Kühlschrank in H_2O bidest aufbewahrt werden, ohne daß sich ihre Eigenschaften verändern.

Mit der so vorbereiteten Dialysiermembran wurden die gleichen Versuche wie mit der unveränderten Dialysiermembran durchgeführt, indem Cytochrom C, Insulin als Einzelkette und Insulin als Doppelkette elektrophoretisch eluiert wurden.

Die Ergebnisse der Versuche zeigten, daß hinsichtlich der Ausbeute von elektrophoretisch eluierten Proteinen bei acetylierter und unbehandelter Membran kein Unterschied zu finden war. Für die untersuchten Proteine Cytochrom C und Insulin war also die Ausbeute bei unbehandelter und acetylierter Membran gleich. Somit ist eine Modifikation der Porenweite der Membran nicht notwendig, da durch die unbehandelte Dialysiermembran Moleküle über MG 3000 nicht hindurchtreten. Erst bei Molekülen unterhalb einem Molekulargewicht von 1000 ist ein signifikanter Verlust an Peptiden durch die acetylierte Membran zu erwarten (69). Die Zeit des Durchtrittes durch die Membran für eine größere Menge an Peptiden ist aber bis zu einem Molekulargewicht von 500 so lang, daß bei einer Elutionsdauer von 90 Minuten noch kein nennenswerter Verlust an Peptiden auftritt.

Lediglich Moleküle mit $MG < 500$ werden beschleunigt selbst durch acetylierte Membranen durchtreten können (69). Es zeigt sich also, daß bei der elektrophoretischen Elution von Polypeptiden bis zu einem Molekulargewicht von 1000 eine nicht acetylierte Membran verwendet werden kann und erst bei Peptiden mit einem noch kleineren Molekulargewicht auf eine in der Porenweite verengerte Membran übergegangen werden sollte. Bis zu einem MG 500 ist dann kein Peptidverlust durch die Membran zu erwarten.

6.5 Optimierung der Methode

6.5.1 Einpolymerisierung von Gelstücken in das Elutionsrohr.

Zur Erzielung einer hohen Ausbeute an eluiertem Protein wurde zunächst versucht, die aus dem Gel ausgeschnittenen Gelbrocken im Elutionsrohr einzupolymerisieren. Durch das im Elutionsrohr festsitzende Gel soll ein möglichst guter Abschluß zwischen Ober- und Unterpuffer erreicht werden. Außerdem gewährleistet ein weitgehend homogenes Gel einen kontinuierlichen Stromfluß bei der elektrophoretischen Elution.

Unter verschiedenen Gelzusammensetzungen konnte schließlich ein Gel zum Einpolymerisieren mit $T = 7\%$, $C = 3\%$, $0,1\%$ SDS, $12,5$ mM Phosphat- NaCl pH 7,2; $2,64$ mM Persulfat und $3,87$ mM TEMED gefunden werden. Diese Gelösung gewährleistete eine gute Verbindung mit den Gelbrocken aus dem ausgeschnittenen Gel. Die Polymerisationszeit war dabei mit 15 Minuten kurz und das Endgel fest und mit glatten Oberflächen.

Zum Einpolymerisieren wurde dabei folgende Technik verwendet (Abb 6).

Das Elutionsrohr wurde um 180° gedreht, unten mit Parafilm verschlossen und mit einer flachen Schicht Glycerin und Bromphenolblau gefüllt. Über dieses dichtere Medium wurde dann zunächst eine flache Schicht Gellösung gefüllt, für 15 Minuten polymerisiert und dann die Gel-flüssigkeit mit den Gelbrocken aufgegeben und oben mit einem Überstehenden Wassertropfen zur glatten Oberflächenbildung abgeschlossen.

Nach der Polymerisation wurde das Elutionsrohr umgedreht und konnte in den Elutionsapparat eingeschraubt werden.

Diese Methode der Einpolymerisierung der zu eluierenden Gelstücke erwies sich am günstigsten gegenüber Polymerisationsverfahren, bei denen das Elutionsrohr mit Parafilm, mit einer Teflonscheibe oder mit einer Glycerinschicht und Parafilm verschlossen wurde.

Ungünstig war auch, einen in einem abgeschlossenen Reagenzglas polymerisierten Gelzylinder nachträglich in das Elutionsrohr einzubringen und durch Quellenlassen im Elutionsrohr dort zu fixieren. Versuche, die Elutionsrohre sowie einen Teil des Bodens des oberen Pufferreservoirs mit Gel zu füllen und dadurch einen guten Abschluß der Pufferräume zu erhalten, waren wegen der verlängerten Polymerisationszeit des eingefüllten Gels nicht geeignet. Ein Auflegen der Gelbrocken auf ein in das Elutionsrohr einpolymerisiertes Untergel erwies sich ebenfalls als nicht effektiv. Hierbei wurde zuerst das Untergel durch eine Vorelektrophorese mit einem Phosphatpuffer (Ober- und Unterpuffer haben gleiche Zusammensetzung): 5mM Na-Phosphat, pH 7,0 ; 0,1% SDS für zwei Stunden

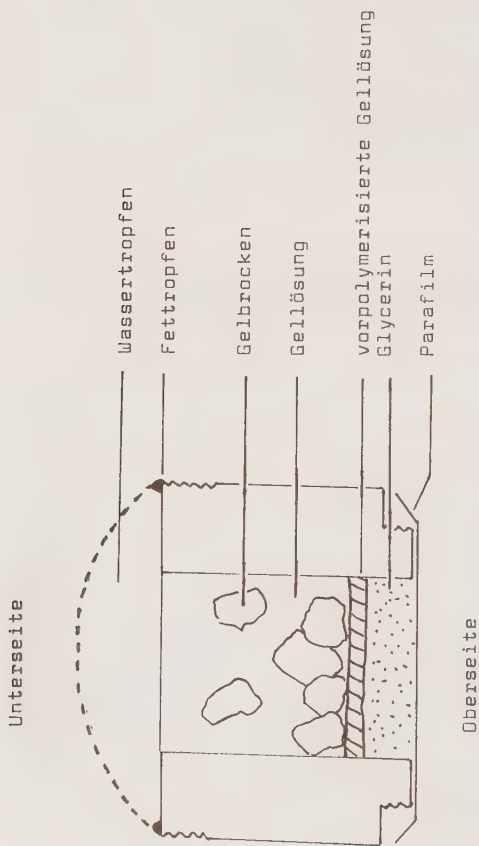


Abb.6: Prinzip der Einpolymerisierung von Gelbrocken
in die Elutionskammer

von etwaigen nicht polymerisierten Acrylamid- und Bisacrylamidmolekülen gereinigt. Eine Überprüfung der elektrophoretisch gewonnenen Eluate von Gelen mit und ohne Vorelektrophorese zeigte jedoch in beiden Fällen etwa gleichviel lösliche Bestandteile des Polyacrylamid-Gels. Eine Vorelektrophorese konnte also die unerwünschte Elution von Gelbestandteilen aus dem Gel nicht vermindern. Die Vorelektrophorese wurde daher weiterhin weggelassen.

Zwar konnte durch ein Einpolymerisieren der Gelbrocken eine geringe Steigerung der Ausbeute an eluiertem Protein im Vergleich zum einfachen Auflegen der Gelstücke auf das Teflonnetz erreicht werden, doch erwiesen sich die Nachteile der Methode als schwerwiegend. Bei längerer Elutionszeit lockerte sich das Gel im Elutionsrohr, wurde nach oben getrieben und drehte sich.

6.5.2 Prüfung verschiedener Puffersysteme zur elektrophoretischen Elution

Zur Steigerung der Ausbeute an eluiertem Protein im Verhältnis zur auf das Gel aufgetragenen Proteinmenge wurde das Puffersystem in der Apparatur zur elektrophoretischen Elution variiert. Dabei wurden 12 verschiedene Puffersysteme erprobt. Tabelle Nr.3 gibt einen kurzen Überblick über die verwendeten Puffersysteme und Abbildung Nr.7 eine schematische Übersicht über die Bereiche der Elutionsapparatur. Als Puffersystem wurden Phosphat, Phosphat-NaCl, Tris-Chlorid und Tris-Glycin-Puffer verwendet.

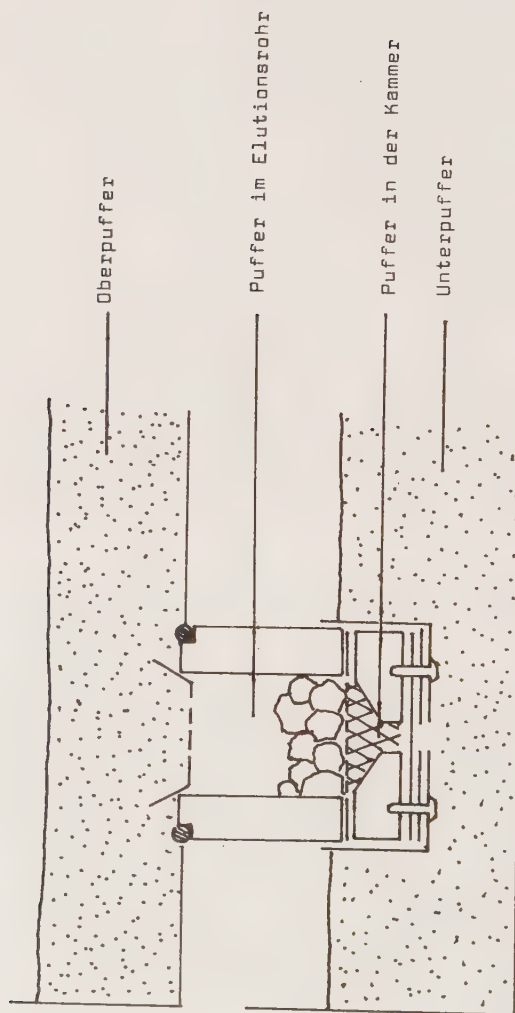


Abb.7: Bezeichnung der Pufferbereiche in der Elutionsapparatur

1.	2.	3.	4.
Oberpuffer	20mM Na-phosphat pH 7,1 0,1% SDS	10mM Na-phosphat pH 7,2 0,1% SDS	20mM Borat 20,5mM Tris pH 8,26 0,1% SDS
Puffer im Elutionsbereich	12,5mM Phosphat-Cl pH 7,2 0,1% SDS 15% Glycerin	5mM Na-phosphat pH 7,2 0,1% SDS 10% Glycerin	a. 5mM Borat 5mM Tris pH 7,5 0,1% SDS 6% Glycerin b. 5mM Tris-Cl pH 6,8 0,1% SDS 6% Glycerin
Puffer in der Kammer			
Unterpuffer	25mM Phosphat-Cl pH 7,2 0,1% SDS	50mM Na-phosphat pH 7,2; 0,1% SDS a. ohne Glycerin b. 15% Glycerin	40mM Borat 41mM Tris pH 8,21 10% Glycerin
Ausbeute	~ 20 %	< 10%	~ 80 %
Bemerkungen	nach längerer Elutionszeit wird der pH-Wert im Oberpuffer stark basisch	pH-Wert im Ober- puffer wird stark basisch	pH-Wert bleibt konstant

* Ausbeute in Prozent der eingesetzten Proteinmenge

Tabelle 3: Puffersysteme, die für die elektrophoretische Elution von Proteinen aus einem Gel untersucht wurden

5.	6.	7.	8.
Oberpuffer	20mM Borat 20,5mM Tris pH 8,26 0,1% SDS	20mM Borat 20,5mM Tris pH 8,26 0,1% SDS	20mM Borat 20,5mM Tris pH 8,26 0,1% SDS
Puffer im Elutionsbereich	a. 5mM Borat 5mM Tris pH 7,5 0,1% SDS 6% Glycerin b. 5mM Tris-Cl pH 6,8 0,1% SDS 6% Glycerin	5mM Borat 5mM Tris pH 7,5 10% Glycerin 0,1% SDS	5mM Borat 5mM Tris pH 7,5 0,1% SDS
Puffer in der Kammer			
Unterpuffer	5mM Tris-Cl pH 6,8 10% Glycerin	80mM Borat 0,082 mM Tris pH 7,2	40mM Borat 41mM Tris-Cl pH 7,2
Ausbeute*	~ 80 %	50- 60 %	~ 70 %
Bemerkungen	der pH-Wert wird nach längerer Elutionsdauer im Oberpuffer stark sauer	pH-Wert konstant, zu gering, Ober- puffer wird stark sauer	pH-Wert konstant

* Ausbeute in Prozent der eingesetzten Proteinmenge

Tabelle 3 : Puffersysteme, die für die elektrophoretische Elution von Proteinen aus einem Gel untersucht wurden

	9.	10.	11.	12.
Oberpuffer	20mM Borat 20,5mM Tris pH 8,26 0,1% SDS	20mM Borat 20,5mM Tris pH 8,26 0,1% SDS	20mM Borat 20,5mM Tris pH 8,26 0,1% SDS	25mM Tris 192mM Glycin pH 8,9 0,1% SDS
Puffer im Elutionsbereich	5mM Borat 5mM Tris pH 7,5 0,1% SDS 15% Glycerin	5mM Borat 5mM Tris pH 7,5 0,1% SDS 15% Glycerin	5mM Borat 5mM Tris pH 7,5 0,1% SDS 11% Glycerin	5mM Borat 5mM Tris pH 7,5 0,1% SDS 11% Glycerin
Puffer in der Kammer			40mM Borat 41mM Tris pH 8,21 15% Glycerin	40mM Borat 41mM Tris pH 8,21 15% Glycerin
Unterpuffer	30mM Borat 34mM Tris pH 7,2	40mM Borat 41mM Tris pH 8,21	40mM Borat 41mM Tris pH 8,21	25mM Borat 192mM Glycin pH 8,9
Ausbeute*	~ 75 %	~ 90 %	90 - 95 %	80 - 90 %
Bemerkungen	pH-Wert konstant	pH-Wert konstant	pH-Wert konstant	pH-Wert bleibt konstant; Puffer- system ist nicht verwendbar, da Glycin die Protein- bestimmung stört

* Ausbeute in Prozent der eingesetzten Proteinmenge

Tabella 3: Puffersysteme, die für die elektrophoretische Elution von Proteinen aus
einem Gel untersucht wurden

Nachteile der Phosphat- bzw. Phosphat-NaCl -Puffer waren geringe Ausbeute (Messung siehe S.78) und ein Ansteigen des pH-Wertes im Oberpuffer in den stark basischen Bereich nach längerer Elutionsdauer. Wurde Tris-Cl im Unterpuffer verwendet, so zeigte sich bei hoher Tris-Cl Konzentration zwar der pH-Wert konstant, die Ausbeute aber niedrig. Umgekehrt war es bei geringer Pufferkapazität von Tris-Cl im Unterpuffer: also Ausbeute hoch, aber Pufferkapazität ungenügend.

Reproduzierbarkeit und konstanten pH zeigte das Tris-Glycin-System. Dieser Puffer konnte aber nicht verwendet werden, da das Glycin die Proteinbestimmung im Eluat stört.

Deutliche Verbesserungen der Ausbeute zeigte ein Tris-Borat-System nach Neville(43) , das modifiziert wurde.

Am günstigsten erwies sich dabei das System 11:

Oberpuffer: 20mM Borat / 20,5mM Tris pH 8,26
0,1% SDS

Puffer im

Elutionsbereich: 5mM Borat / 5mM Tris pH 7,50
0,1% SDS, 11% Glycerin

Puffer im

Kammerbereich: 40mM Borat / 41 mM Tris pH 8,21
Kein SDS, 15% Glycerin

Unterpuffer: 40mM Borat / 41 mM Tris pH 8,21
kein SDS, kein Glycerin

Das Puffersystem zeigte eine gute Reproduzierbarkeit, hatte eine hohe Pufferkapazität, lieferte eine maximale Ausbeute (etwa 90-95%) und störte die nachfolgende Proteinbestimmung im Eluat nicht.

6.5.3 Versuche zur Steigerung der Proteinkonzentration im Eluat

Aus der Elutionskammer, die ein Volumen von 300 μ l besitzt, kann nach Abschluß der Elution durch Abschrauben der Elutionskammer das Protein mit einer Pipette unter Sicht abgesaugt werden. Zur Erhöhung der Proteinkonzentration bei geringen Elutionsmengen boten sich drei Möglichkeiten an:

1) Verkleinerung der Elutionskammer.

Diese Möglichkeit ist grundsätzlich gegeben, doch ist die Kammer aus Gründen der Handhabung und einer Veränderung der Elutionsbedingungen nicht beliebig zu verkleinern. Von Vorteil ist das definierte Flüssigkeitsvolumen in der Kammer, das quantitativ absaugbar ist.

2) Versuch der Ausfällung von Protein aus dem Eluat. Nach der Elution kann durch Zugabe von Trichloressigsäure (Endkonzentration 20 %) das Protein ausgefällt werden. Diese Möglichkeit setzt aber eine ausreichend hohe Proteinkonzentration voraus.

Trotzdem war auch bei niedriger Konzentration an Protein im Eluat eine Ausfällung möglich. TCA wird dabei auf eine Endkonzentration von 20 % dem Eluat zugegeben, wobei man nach dem Abzentrifugieren der Überstehenden Lösung das Präzipitat gewinnt. Durch dreimalige Zugabe von Diäthyläther und Zentrifugieren läßt sich die TCA auswaschen. Anschließend wurde das Präzipitat durch Puffergabe mit hoher SDS-Konzentration (125 mM Tris-Cl pH 6,8; 0,5 % SDS) und Erhitzen auf 100°C für 5 Minuten teilweise wieder in Lösung gebracht. Man erhält so einen Teil des Eluatproteins wieder in Lösung, wobei das Volumen der Lösung mit dem Eluatprotein durch die Zugabe an Puffervolumen bestimmt werden kann. Der ganze Vorgang beruht darauf, daß ein Teil des

eluierten Proteins zusammen mit ebenfalls elektro-phoretisch eluierten Gelbestandteilen ausgefällt und anschließend wieder ein Teil des Proteins aus dem Copräzipitat in Lösung gebracht werden kann. Insgesamt ergibt sich aber ein großer Verlust an eluiertem Protein, da nur ca. 20-30 % des vorhandenen Proteins copräzipitiert und davon wiederum nur etwa die Hälfte wieder in Lösung gebracht werden kann.

3) Zugabe von Glycerin in die Elutionskammer:

Während der Elution sammelt sich das aus dem Gel freigesetzte Protein unmittelbar vor der Dialysiermembran, was bei Fluram-markierten Proteinen im Vorversuchsmodell gut unter der UV-Lampe beobachtet werden kann. Nach dem Abschalten des Stromes verteilt sich das so konzentrierte Protein im gesamten Kammervolumen, bedingt durch Konvektion und mechanische Irritation beim Versuch, das Protein zu gewinnen. Gibt man Glycerin in die Elutionskammer, so folgen daraus zwei Vorteile:

Während der elektrophoretischen Elution dringt das Protein bei Abwesenheit von Glycerin nach längerer Elutionsdauer in die Dialysiermembran ein, wo es präzipitiert. Dies zeigt sich durch einen opaken Hof in der Dialysiermembran nach der Elektrophorese und in einer Verminderung der Ausbeute. Durch Glycerin kann dieser Effekt vollständig vermieden werden. Hemmend auf die Adsorption und Einwanderung von Eluatprotein in die Membran wirkt auch die hohe Ionenstärke des Unterpuffers. Gibt man in den Bereich der Kammer eine 15 %ige Glycerin-Puffer-Lösung und überschichtet ab dem Teflonnetz den Elutionsbereich mit 11 % Glycerin-Pufferlösung,

so bildet sich während der Elution, bedingt durch das Herabsinken des schweren Glycerins in den Unterpuffer direkt vor der Dialysiermembran ein Glyceringradient aus, in den das Protein einwandert. Somit konzentriert sich das Protein unmittelbar vor der Dialysiermembran in der Glycerinlösung, wo es nach dem Abschalten der Spannung nur langsam herausdiffundiert. Nach dem Abschrauben der Elutionskammer kann dann mit der Pipette zuerst eine 150-200 μ l große Puffermenge entnommen werden, die kein eluiertes Protein enthält. Die verbleibenden 100 μ l direkt auf der Dialysiermembran enthalten das gesamte Protein. Mischt man ganz vorsichtig vor dem Absaugen des Restvolumens mit der Spitze der Pipette die Lösung, so zeigt sich eine Schlierenbildung in der Flüssigkeit, die durch das Aufwirbeln des Glycerins bedingt ist. Das zu gewinnende Restvolumen mit dem gesamten Eluatprotein kann bis auf 80 - 100 μ l eingeengt werden, ohne daß dabei ein Proteinverlust entsteht. Will man in noch kleineren Volumen konzentrieren, so muß man einen Verlust an Material in Kauf nehmen, der aber erst dann sehr stark ansteigt, wenn man die unmittelbar vor der Dialysiermembran liegende Glycerinschicht aufwirbelt oder mit der Pipette aufsaugt.

Die Ausbildung eines Glyceringradienten in der Elutionskammer kann auch noch auf andere Weise gezeigt werden. Gibt man nämlich in den Unterpuffer und in die Elutionskammer eine hohe Glycerinkonzentration (25 %) und überschichtet diese dann im Elutionsrohr mit einer Lösung von niedrigerer Glycerinkonzentration (10 %), so bietet das zwar den Vorteil, daß die Pufferphasenverhältnisse im Puffersystem längere Zeit aufrecht erhalten werden können, aber verhindert ein Absinken des Glycerins durch die Dialysiermembran in den

Unterpuffer und damit die Ausbildung des Glyceringradienten. Zwar findet man immer noch eine Anreicherung von Eluatprotein vor der Dialysiermembran, doch weit geringer als bei vorgenanntem Fall. Die Konzentration des eluierten Proteins unmittelbar vor der Dialysiermembran wurde also durch Zugabe von Glycerin in den Kammerpuffer und Elutionspuffer erhöht. Die Ausbildung des Glyceringradienten steigert die Ausbeute an Protein unmittelbar vor der Dialysiermembran um das Drei- bis Fünffache. Nachteilig ist nur, daß sich die unterschiedlichen Puffersystemphasen nach längerer Elutionsdauer verschieben, was man durch die Bildung von Glycerinschichten von unten nach oben länger verzögern könnte. Dieser Vorgang der Verschiebung der Puffersysteme ist aber für die Elution nicht von entscheidender Bedeutung.

6.5.4 Optimierung der Bedingungen für Zeit, Spannung und Stromstärke während der elektrophoretischen Elution.

Als günstiger Stromstärkewert während der Elektrophorese erwies sich eine Stromstärke von $I = 10 \text{ mA}$ pro Rohr. Bei geringerer Stromstärke verlängert sich die Elutionszeit, während bei zu hoher Stromstärke gleichzeitig die Spannung mit ansteigt und dadurch die Wärmeentwicklung zu hoch wird.

$$H = \frac{I \cdot U}{A}$$

H: elektrische Wärme

A: elektrisches Wärme-
äquivalent

Die Stromstärke wird während des Elutionsvorganges konstant gehalten. Bei einer Stromstärke $I = 10 \text{ mA}$ ergibt sich bei der elektrophoretischen Elution von Albumin aus dem Gel eine Ausgangsspannung von 160V, die nach 30 Minuten auf 135 V, nach 40 Minuten auf 125 V und sich dann nach 60 Minuten auf 120 V einstellt und unverändert bleibt.

Bei der elektrophoretischen Elution von Band-3-Protein ergibt sich eine Anfangsspannung von 80 - 90 V, die zunächst kurz abfällt und dann auf dem alten Niveau konstant bleibt (Abb.Nr.8).

Bei der zeitlichen Verteilung der Ausbeute an eluiertem Protein nach unterschiedlich langen Elutionszeiten mit $I = 10 \text{ mA}$ (Abb.Nr.9) zeigte sich ein Anstieg der Proteinkonzentrationen im Eluat bis 50 Minuten, wo ein Maximalwert (ungefähr 95 % Ausbeute) erreicht wurde. Bereits nach 20 Minuten waren 65 % eluiert. Nach zwei Stunden Elutionsdauer fiel die Ausbeute an Protein ganz langsam wieder ab, was auf ein Anlagern der Proteine an die Dialysiermembran und auf Konvektion zurückzuführen ist. Die Ausbeutemessungen erfolgten nach Elektrophorese des gewonnenen Eluates in einem Gel und Färbung der Proteine mit Coomassieblau durch ein Densitometer (siehe S.78). Dabei ist die Elutionszeit für eine optimale Ausbeute von der Größe der Gelbrocken im Elutionsrohr abhängig. Durch Zerschneiden des Stäbchengels verringert sich die Elutionszeit. Optimale Bedingungen werden also bei $I = 10 \text{ mA}$, $t = 90 \text{ Minuten}$ und zerschnittenen Gelbrocken gefunden. Die Gelbrocken sollten dabei klein sein - Größe etwa $0,2 \times 0,2 \times 0,2 \text{ cm}$ - jedoch sollte man

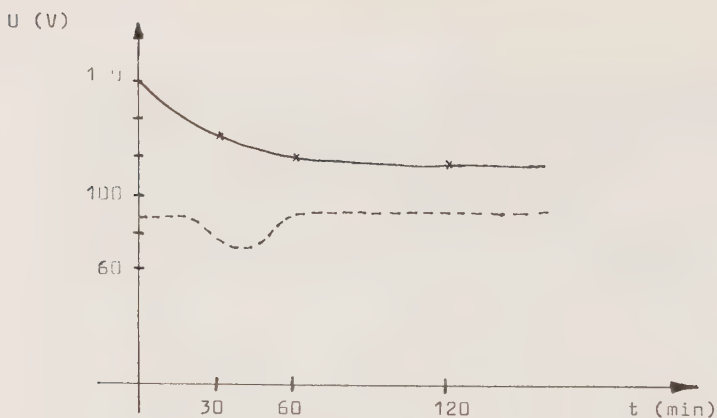


Abb.8: Abhängigkeit der Spannung von der Dauer der elektrophoretischen Elution. Untersucht für — Albumin
 ---- Band-3- Protein
 Bedingungen der Elektrophorese siehe Text S.40.

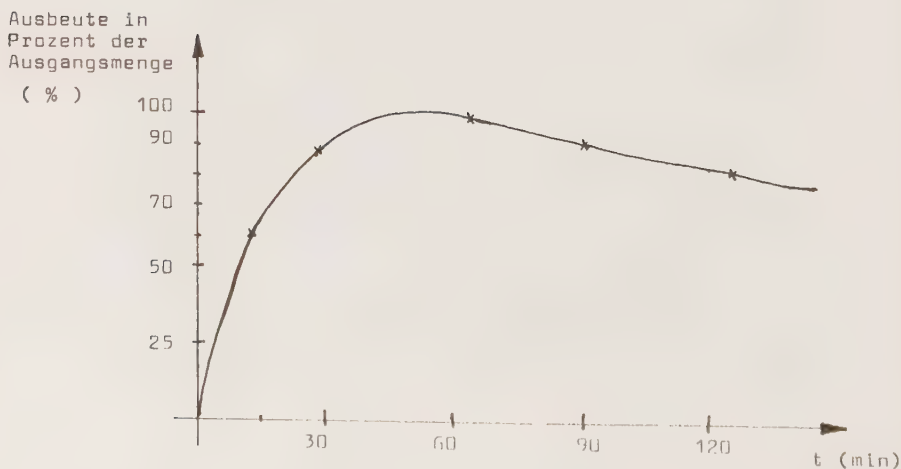


Abb.9: Abhängigkeit der Ausbeute an Protein von der Dauer der elektrophoretischen Elution. Untersucht für Albumin

die Stückchen nicht zu klein machen, um das Gel beim Zerschneiden mit dem Skalpell nicht zu zerdrücken. Eine Gasblasenbildung, die durch Erwärmen des Unterpuffers während der Elution entsteht, wurde durch Evakuieren und leichtes Anwärmen (ungefähr 35°C) des Unterpuffers vor der Elution verhindert. Dadurch kann die Bildung von Luftblasen direkt unterhalb der Dialysiermembran, die die elektrophoretische Elution stören, vollständig verhindert werden. Ein flacher Boden der äußeren Elutionskammer verhindert ebenfalls die Bildung von Gasblasen. Zusatz von 10 - 20 % Glycerin im Unterpuffer kann die Gasblasenentwicklung zusätzlich stark verzögern.

6.6 Praktische Handhabung des entwickelten Gerätes zur elektrophoretischen Elution.

1. Das untere Pufferreservoir wird mit 250 - 300 ml auf etwa 35° C erwärmten und evakuierten Unterpuffer gefüllt (Abb.10).

2. Zusammensetzen des Elutionsrohres.

Beim Verschrauben der Elutionskammer und des Elutionsrohres muß darauf geachtet werden, daß keine Luftblasen in das System geraten. Deshalb wird das Zusammensetzen der Einzelteile unter Puffer vorgenommen (Puffer des Kammerbereiches). Insbesondere sollen auch keine Luftbläschen in dem kleinen Netz oberhalb des Elutionskammerblockes sein. In die äußere Elutionskammer werden nacheinander vorsichtig die Teflonscheibe, die Dialysiermembran und der Elutionskammerblock eingeführt. Anschließend wird das System von außen durch die beiden Teflonschrauben miteinander verbunden.

Ebenfalls unter Puffer wird das Teflonnetz aufgesetzt und das Elutionsrohr mit der äußeren Elutionskammer fest verschraubt. Das Elutionsrohr sollte jetzt teilweise mit Puffer gefüllt sein.

Anschließend wird das Elutionsrohr mit dem Gummidichtungsring versehen und mit dem oberen Pufferreservoir verschraubt. Das obere Pufferreservoir wird nun auf das untere aufgesetzt, wobei das Elutionsrohr in den Unterpuffer taucht, der nur so hoch stehen sollte, daß er die Plexisgasherstellung der äußeren Elutionskammer nicht übersteigt.

3. Nach vorsichtigem Absaugen des Puffers im Kammerbereich bis kurz vor das Netz mit einer Kolbenhubpipette wird das Elutionsrohr halb mit Elutionsbereichspuffer gefüllt.
4. Die aus dem zerschnittenen Stäbchen-Gel gewonnenen Gelbrocken, die vorher 5-10 Minuten im Elutionsbereichspuffer äquilibriert wurden, werden dann luftblasenfrei auf das Teflonnetz aufgelegt. Die Dimensionen der Elutionsröhre sind so bemessen, daß das Rohr mit Gelschnitzeln aus einem 4 cm hohen Gelstäbchen (0,5 cm Durchmesser, Volumen $\sim$ 0,8 ml) beladen werden kann. Wesentlich mehr Gelbrocken sollten nicht eingefüllt werden, da sonst das Abschlußnetz nicht mehr eingebracht werden kann oder dabei Gelbestandteile durch das untere Netz in den Elutionskammerblock gepreßt werden können. Ebenso steigt die Gefahr, daß durch Quellen der Gelbrocken im Puffer während der Elution das Netz hochgeschoben wird und Gelbrocken in den Oberpuffer getrieben werden.
5. Das Elutionsrohr wird nach oben hin mit einem elastischen Teflonnetz verschlossen. Vorsichtig wird dann der Oberpuffer überschichtet und das obere Pufferreservoir mit 200 ml Puffer gefüllt.
6. Während der Elektrophorese sollte die Elutionsapparatur waagrecht und erschütterungsfrei stehen.

Beim Entnehmen des elektrophoretisch eluierten Proteins wird wie folgt verfahren:

1. Wichtig ist, daß beim Auseinandernehmen des Systems der Elutionskammerblock immer waagrecht gehalten wird und man möglichst ruhig und erschütterungsfrei arbeitet.

2. Das Elutionsrohr wird vorsichtig aus dem oberen Pufferreservoir geschraubt, wobei der Oberpuffer aus der Öffnung abfließt.
3. Nach Entfernen des Teflonnetzes wird der Puffer im Elutionsrohr bis zum Netz abgesaugt.
4. Mit einer Pinzette werden die Gelbrocken entfernt.
5. Durch Abschrauben des Elutionsrohres kann die Elutionskammer freigelegt werden.
6. Mit einer Kanüle oder mit einer feinen Pinzette wird das Teflonnetz vorsichtig abgehoben und mit einer Pipette 150 - 200 μ l Puffer von den Rändern des Elutionsblockes her abgesaugt.
7. Anschließend wird unter Mischen mit der Pipettenspitze die Glycerin-Puffer-Proteinschicht vor der Dialysiermembran abgesaugt.

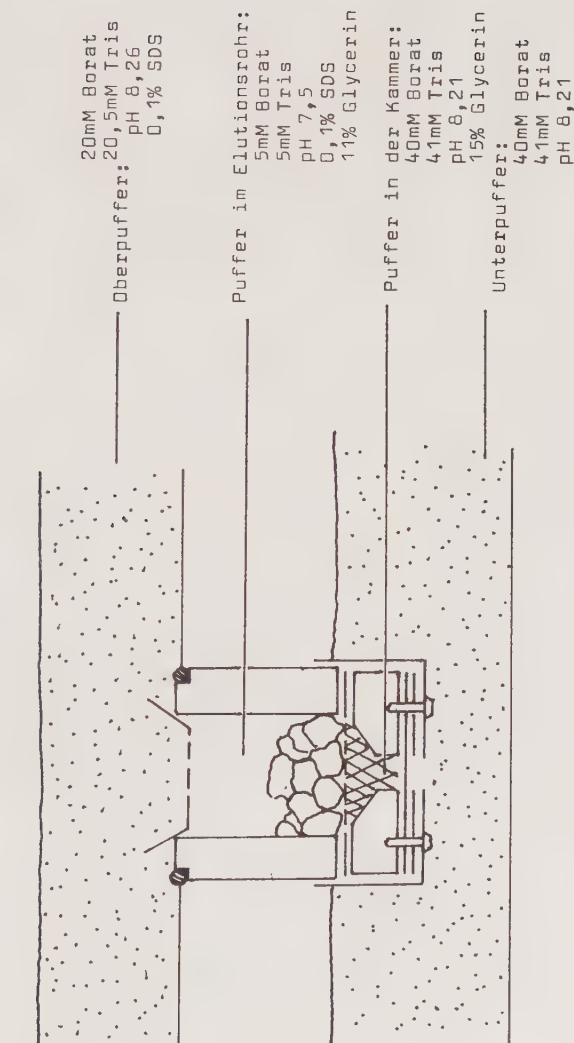


Abb. 10: Puffer für die elektrophoretische Elution mit Erklärung der Pufferbereiche

7. Anwendung des Verfahrens der elektrophoretischen Elution von Protein

7.1 Elektrophoretische Elution verschiedener Proteine

Zur Demonstration der Anwendbarkeit der Methode der elektrophoretischen Elution aus Gelstücken wurde die Elution mit verschiedenartigen Proteinen durchgeführt und Ausbeute, Reproduzierbarkeit und Nichtaggregation der Proteine gezeigt. Die Elution wurde mit Cytochrom C (MG 12500), Rinder Serum-Albumin (MG 67000), Insulin B als Einzelkette (MG 3400) sowie Doppelkette (MG 6800) und der Bande B der Erythrocytenmembran (MG 98000-118000) durchgeführt.

Die Versuche wurden wie vorstehend beschrieben in einem Tris/Boratsystem mit Tris-Cl-Gel T = 7,5 % und C = 2 % durchgeführt. Cytochrom C braucht nicht markiert werden, da es durch seine rote Eigenfarbe im Gel nach der Elektrophorese als schmale Bande gefunden und ausgeschnitten werden konnte. Albumin, Insulin B, dem bei der Untersuchung als Insulineinzelkette β -Mercaptoäthanol zur Reduktion von Disulfidbrücken beigegeben wurde (siehe S. 77), sowie die Proteine der Erythrocytenmembran wurden mit Fluorescamin markiert (siehe S. 80) und konnten so nach der Elektrophorese im UV-Licht ($\lambda = 360 \text{ nm}$) identifiziert werden.

Es zeigte sich, daß sowohl mit großen wie kleinen Proteinen die Elution problemlos durchzuführen ist und jedesmal eine Ausbeute von 80-90 % erreicht werden kann (siehe S. 78). Während der Elution tritt keine Aggregation von eluiertem Protein ein, was sich durch gleiches Wanderungsverhalten der eluierten Proteine in einer erneuten Elektrophorese im Vergleich mit einer Referenzprobe deutlich macht.

Um die Verwendbarkeit zur Isolierung und Gewinnung von Proteinen der Erythrozytenmembran mit der Methode der Elution zu demonstrieren, wurde das Band-3-Protein (Bande B) aus der Erythrozytenmembran elektrophoretisch eluiert und näher untersucht. Es handelt sich dabei um ein besonders schwer zu isolierendes Protein, das zu den integrierten Membranproteinen gerechnet wird. Bisher ist es noch nie gelungen das Protein selektiv von allen anderen Proteinen zu trennen, in Reinform darzustellen oder auch nur größere Mengen zu isolieren.

7.2. Trennung der Bande B von Glykophorin im Gel.

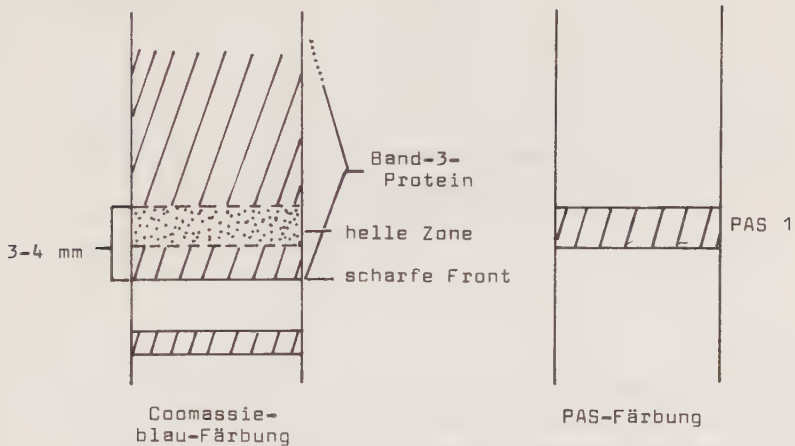
Bei der Elektrophorese der Proteine der Erythrozytenmembran zeigt sich im Bereich der Bande B eine starke Anhäufung von Proteinen. Eng benachbart liegen die coomassieblau-positiven Proteine der Bande B sowie das PAS-positive Protein Glykophorin. Bei ungünstiger Wahl der Puffer- und Gelbedingungen zeigt sich dieser Bereich oftmals als einheitliche Bande in der Coomassieblaufärbung, da bei der Elektrophorese eine Trennung im Gel wegen der nahezu gleichen Molekulargewichte ausgeblieben ist. Um für diesen Bereich eine gute Trennung der Proteine zu erreichen, die auch in der Coomassieblau-Färbung sichtbar ist, wurde die Puffer- bzw. Gelzusammensetzung variiert.

Der Tris/Borat-Puffer sowie die Gelzusammensetzung von T = 7,5 % und C = 2 % mit Tris - Cl als Puffer (siehe S. 8) erwiesen sich dafür als optimal. Besonders im Bereich B und C tritt eine starke Trennung der Einzelbanden auf, während der Bereich A kaum aufgetrennt wird.

Der Bereich B zeigt sich in der Coomassieblau-Färbung als eine Bande mit scharfer Front und wenige Millimeter hinter der Front einer deutlichen Aufhellung der Bande. Anschließend folgt eine große, intensiv gefärbte und nach oben hin an Farbintensität stark abnehmende Zone. Da Glykophorin auf Grund seines ähnlichen Molekulargewichtes in dieser Bande wandern muß, wurde die Bande B sowie das Glykophorin auf drei verschieden Arten lokalisiert:

1. Auf zwei in gleicher Weise behandelte Gele (aus dem gleichen Gießvorgang) wurden jeweils 70µl Ghostsuspension (entspricht 250µg Protein) aufgetragen und die Membranproteine durch eine Elektrophorese getrennt. Anschließend wurde das eine Gel mit Coomassieblau gefärbt, um die Proteine (Bande B) darzustellen, während das andere Gel mit PAS für Glykoproteine (Glykophorin) gefärbt wurde.
2. Ein ähnlicher Versuch wurde durchgeführt, wobei nur ein Gel verwendet wurde, auf das 70µg Ghostsuspension aufgebracht wurden. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einer Schneidevorrichtung mit einem dünnen Draht der Länge nach geschnitten und die beiden Gelhälften mit Coomassieblau sowie PAS gefärbt.

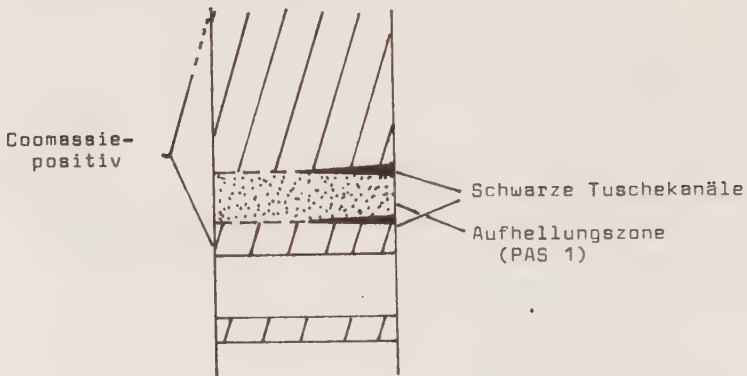
Bei der Beurteilung der Versuche 1 und 2 zeigte sich folgendes Färbbild:



Dort wo sich im Bereich der Coomassieblau-positiven Bande eine Aufhellungszone zeigte, lag im PAS gefärbten Gel die Bande PAS 1 (Glykophorin) als scharfe Farbzone. Bei einer Markierung der Proteine mit Fluorescamin zeigt sich ebenfalls eine etwas weniger stark fluoreszierende Aufhellungszone im B-Bereich unter dem UV-Licht, die aber nicht so deutlich sichtbar wird wie bei Coomassieblau-Färbung.

- 3) Um die Lage der PAS positiven Glykophorinbande direkt im Coomassieblau-positiven Bandenbereich darzustellen, wurden nach Elektrophorese einer Ghostsuspension (70 μ l) eine Färbung nach PAS durchgeführt. Die PAS 2 Bande wurde an ihren Rändern markiert, indem mit einer unter dem Bunsenbrenner fein ausgezogenen Pipettenspitze etwas schwarze Tusche an den Rändern der PAS positiven Bande in das Gel injiziert wurde. Anschließend wurde das Gel mit Coomassieblau für 6 Stunden nachgefärbt.

Dabei zeigte sich folgendes Bild:



Im Bereich der vorhergehend gefärbten PAS Zone stellte sich nun die Aufhellungszone in der Coomassieblau-Färbung dar. Die Ränder des hellen Bereiches lagen genau dort, wo die schwarzen Tuschekanäle die Ränder des Glykophorinbereiches markiert hatten.

Glykophorin und Protein-3 lassen sich bei geeigneten Gel- und Pufferbedingungen gut elektrophoretisch trennen. Da die elektrophoretische Elution und damit die Gewinnung der Bande B aber im Anschluß an die vorausgehende Trennung durch Elektrophorese erfolgen muß, kann eine Färbung nicht durchgeführt werden. Durch Vermessen der Wanderungsstrecken der Bande B bzw Glykophorin in gefärbten Gelen kann man Richtwerte für die Wanderung dieser Banden in ungefärbten Gelen, die sonst in gleicher Weise behandelt wurden, erhalten. Dieses Verfahren des Ausschneidens von Banden ohne vorangegangene Färbung der Gele ist allerdings mit großen Fehlermöglichkeiten behaftet. Deshalb wurde die Trennung mit fluorescamingefärbten Proteinen durchgeführt. Da Glykophorin zwar schwächer wie Bande B markiert wird, aber eine sichtbare Aufhellungszone in der Fluorescaminfärbung nicht deutlich genug abgrenzbar ist,

wurde bei der Gewinnung des Protein-B das Gel 5 mm anodenwärts von der scharfen Front durchgeschnitten und nur das Protein anodenwärts verwendet. Dadurch wird Glykophorin abgeschnitten. Allerdings tritt hierbei ein Verlust an Protein der Bande B ein. Eine Verunreinigung des Materials durch PAS positive Proteine (Glykophorin) ist nicht auszuschließen, wobei man die Glykophorinverunreinigungen durch exaktes Vermessen der Bandenlänge und sauberes Abschneiden vermindern kann.

7.3. Gewinnung des Band-3-Protein

Bedingt durch die technische Handhabung der Gewinnung der Bande B kann Protein der Bande B nicht selektiv isoliert werden. Verunreinigungen des Proteineluates mit Glykophorin sind deshalb möglich. Zur Anreicherung von Protein wurde eine wiederholte Elektrophorese mit jeweils 8 Gelstäbchen durchgeführt, wobei jedes Gel mit 90 μ l Ghostsuspension (entspricht ungefähr 330 μ g Protein) beladen wurde. Die Bande B wurde aus den fluorescamingefärbten Gelen unter dem UV-Licht mit einem Skalpell herausgeschnitten und die zerschnittenen Gelstückchen in die Elutionsapparatur eingebracht (8 ausgeschnittene Gelstückchen für 3 Elutionsrohre). Das Eluat wurde gesammelt, wobei ein Proteingehalt von 2,4 μ g/ μ l Protein B im Eluat erreicht wurde.

7.4 Prüfung, ob Band-3-Protein nach längerer Zeit aggregiert

Vu und Steck (73) fanden bei der Isolierung von Band-3-Protein, daß das Protein in Triton-X-100 Lösung allmählich aggregiert und selbst durch Erhitzen nicht wieder in Lösung gebracht werden kann. Die Autoren beseitigten diesen Nachteil durch schnelles Einfrieren der Lösung in einem Trockeneisbad.

Zur Prüfung, ob Protein-3 nach der elektrophoretischen Elution im Eluatpuffer (Tris/Borat, 0,1 % SDS) aggregiert, wurde die Lösung eingefroren und nach 2 bzw 4 Monaten wieder aufgetaut. Durch eine SDS-PAGE der "gealterten" Proteineluate mit Vergleichsgelen, die frisch eluiertes Band-3-Protein, sowie andere Gele, die sämtliche Membranproteine enthielten, konnte festgestellt werden, daß sich gleiches Bandenmuster im B - Bereich ergab. Damit konnte eine Aggregation des Proteins in der Eluatlösung ausgeschlossen werden (Abb.11).

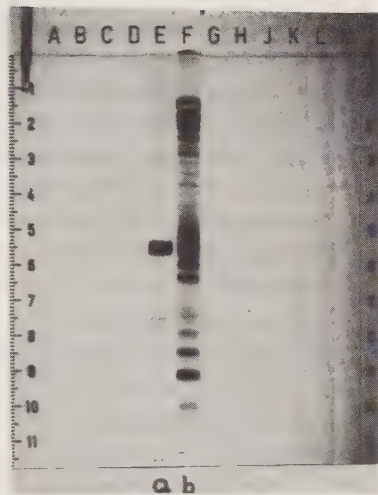


Abb.11: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Proteine der menschlichen Erythrozytenmembran(b). Band-3-Protein wurde aus dem Gel ausgeschnitten und elektrophoretisch eluiert (a). Bedingungen der Elektrophorese siehe S.8. Bedingungen der elektrophoretischen Elution siehe S.44.

8. Kurze Charakterisierung von Band-3-Protein.

Protein-3 — auch als Protein E (70) und Bande B bezeichnet — bildet eine der Hauptkomponenten der Erythrozytenmembran beim Menschen. Es stellt ungefähr 25 - 30 % (7, 12) des gesamten Membranproteins dar und zählt zu den integrierten Membranproteinen. Sein Molekulargewicht liegt bei 98 000 - 118 000 (8). In der SDS-PAGE wandert es als ziemlich breite Bande mit scharfer Front und diffuser Obergrenze. Dies könnte bei Annahme nur eines Proteins als Protein-3 (71) durch eine Heterogenität im Kohlenhydratanteil bedingt sein (12, 72 - 74). Wahrscheinlich ist Protein-3 aber heterogen (8, 75).

Protein-3 ist transmembranär in der Erythrocytenmembran orientiert, durchzieht diese einmal (12, 13, 76), vielleicht aber auch S-förmig zweimal (77) oder mehrmals (78). Bei radioaktiver Markierung von inside-out bzw. right-side-out Vesikeln zeigt sich, daß Band-3 sowohl einen äußeren Anteil wie einen cytoplasmatischen Anteil besitzt (62, 79, 80). Dazwischen liegt ein hydrophober Bereich, der in die Erythrozytenmembran integriert ist. Dies läßt sich auch bei enzymatischer Verdauung von Band-3-Protein in situ zeigen, wo die Hydrolyse beschränkt ist, während freies Band-3-Protein von den gleichen Enzymen vollständig hydrolysiert wird (81). Wahrscheinlich liegt das NH_2 -terminale Ende des Proteins an der Innenseite der Membran (71).

Band-3-Protein zeigt eine Assoziation mit Aldolase (14, 15), Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase (16) und Cholesterin (17). 5 - 8 % des Trockengewichtes

bestehen aus Kohlenhydraten, vornehmlich Mannose, Galaktose und N- Acetylglucosamin (82).

Alle Oligosaccharide sind in einen bestimmten Bereich der Kette gelegen (83).

Eine Rolle im Anionentransport (18 - 20, 83 - 85), Monosaccharidtransport (21, 22, 86), sowie Wassertransport (23) werden dem Band - 3 - Protein zugesprochen. Neuere Arbeiten hingegen nehmen eine andere Gruppe von Membranproteinen für den Glukosetransport an (87, 88).

Protein-3 bindet sich an Concanavalin A (85) und Ricinus communis-Lektin (72, 89, 90), was auch zur selektiven Gewinnung mit Hilfe einer Affinitäts-chromatographie ausgenutzt wurde.

Zwei genetische Varianten von Protein-3 wurden gefunden. En (a-) Erythrozyten scheint Glycophorin (PAS 1 vollständig, PAS 2 teilweise) zu fehlen, während Band-3-Protein eine andere Kohlenhydratzusammensetzung als bei normalen Erythrocyten aufweist (91).

Eine andere Variante, die in 6 - 7 % der Bevölkerung vorkommen soll, zeigt bei Hydrolyse des Band-3-Proteins mit Pronase ein Fragment mit höherem Molekulargewicht im Vergleich mit dem normalen Spaltprodukt. Offenbar liegt hier ein zusätzliches Segment im Bereich der Cytoplasma-Seite des transmembranen Proteins vor (92). Beide Varianten zeigen keine klinischen Abnormitäten, könnten sich aber bei der Aufklärung der Funktion von Band-3-Protein als hilfreich erweisen.

9. Enzymatische Spaltung von Band - 3 - Protein

9.1 Praktische Durchführung der partiellen enzymatischen Hydrolyse

Zur näheren Untersuchung und Charakterisierung wurde das durch elektrophoretische Elution gewonnene nicht vollständig reine Band-3 mit verschiedenen Enzymen partiell hydrolysiert, die Spaltprodukte anschließend in Flachbettgelen elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. Verwendet wurden die Enzyme

α - Protease

Staphylococcus aureus Protease

Pronase P

Trypsin

Thermolysin

Papain

Proteinase K

Eine kurze Charakterisierung der Enzyme findet sich im nächsten Kapitel.

Die Enzymlösungen wurden durch Einwiegen kleiner Mengen der jeweiligen Enzyme und Lösen in 0,1 M Tris pH 7,8 hergestellt. Alle Inkubate besaßen die gleiche Substratkonzentration.

Inkubationsansatz:

40 μ l Band-3-Protein Eluat (Proteingehalt
2,4 μ g/ μ l $\rightarrow$ 88 μ g Protein)
+ 5 μ l 1M Tris pH 7,8
+ 20 μ l Glycerin (99%)

Der 1 M Trispuffer wurde zur Einstellung des pH-Wertes auf ungefähr pH 8 der Inkubation zugegeben. Glycerin sollte im Inkubat etwa 20 - 25 % erreichen, was ein späteres Auftragen auf die Taschen des Flachbettgels erheblich erleichtert. SDS sollte dem Inkubationsansatz

nicht zusätzlich zugegeben werden - außer den 0,1 % SDS aus der Elution - da SDS die Aktivität der Enzyme beeinflussen kann (93).

Die Proben wurden anschließend in einem Wasserbad auf die jeweilige Inkubationstemperatur (25°C oder 37°C) gebracht und dann die Enzymlösung ($8\ \mu\text{l}$) zugegeben. Zu verschiedenen Zeiten wurden dann $10\ \mu\text{l}$ (für 2 Ansätze $20\ \mu\text{l}$) Proben entnommen, mit einer fünffach-konzentrierten Inkubationslösung versetzt und das Protein durch Erhitzen denaturiert.

Die fünffach-konzentrierte Inkubationslösung enthielt

15 % SDS

10 mM EDTA

5 % β - Mercaptoäthanol,

so daß nach Zugabe zur Probenlösung eine Konzentration von 3 % SDS, 2 mM EDTA und 1 % β -Mercaptoäthanol eingestellt wurde.

Inkubation:

20 μl Probe

+ 4 μl 5-fach konzentrierte Inkubations-
lösung

Sofort nach Entnahme der Probe aus der Enzym-Inkubationslösung und Zugabe der fünffach konzentrierten Lösung wurde der Ansatz für 3 Minuten in ein Wasserbad von 100°C gestellt, um das Enzym zu inaktivieren. Anschließend konnte die Probe zur Elektrophorese verwendet oder eingefroren werden.

Aus einer großen Anzahl von Enzym-Inkubationsversuchen werden durch Variation von Enzym-Substratverhältnis, Inkubationstemperatur und Inkubationszeit die optimalen Werte für die partielle enzymatische Hydrolyse von Band-3-Protein ermittelt.

Nachfolgende Tabelle Nr 4 gibt einen kurzen Überblick über die gefundenen Ergebnisse:

Enzym	Inkubation Temp.	Substrat: Enzym	Zeitpunkt der Probenentnahme	Entnommenes Volumen/Zeit	Enzymeinswaage	Bemerkungen
α -Protease	37°C	20:1	0, 2, 4, 8, 28 (h)	20 μ l	6 μ g/10 μ l Lösung	Enzym wenig aktiv, Zeiten unter 2 Stunden erbringen kaum eine Hydrolyse des Proteins
Staphylococcus aureus Protease	37°C	20:1	0, 15, 30, (min)	20 μ l	6 μ g/10 μ l Lösung	gute Spaltung des Substrates
Protease P	25°C	50:1	0, 15, 30 (min)	20 μ l	2,4 μ g/10 μ l Lösung	Enzym sehr aktiv, nach 20 min Substrat bereits vollständig hydrolysiert
Trypsin	37°C	15:1	0, 2, 0, 28 (h)	20 μ l	8 μ g/10 μ l Lösung	Hydrolyse erst ab zwei Stunden sichtbar
Thermolysin	37°C	50:1	0, 15, 30 (min)	20 μ l	2,4 μ g/10 μ l Lösung	Enzym sehr aktiv, nach 60 min Hydrolyse vollständig
Papain	37°C	25:1	0, 2, 4 (h)	20 μ l	4,9 μ g/10 μ l Lösung	Enzym wenig aktiv
Proteinase K	25°C	100:1	0, 5, 10 (min)	20 μ l	1,2 μ g/10 μ l Lösung	Enzym sehr aktiv, Hydrolyse nach 15 min vollständig

Tabelle 4 : Optimale Versuchsbedingungen für die partielle enzymatische Hydrolyse von

Band-3-Protein aus der menschlichen Erythrocytenmembran.

Der Zeitpunkt 0 Minuten für die Probenentnahme bedeutet, daß nach Zugabe der Enzymlösung zum Inkubat mit dem Band-3-Protein sofort die Probenlösung entnommen wurde.

9.2 Substratspezifität und Eigenschaften der verwendeten Enzyme

Die partielle enzymatische Hydrolyse der eluierten Bande 8 aus der Erythrocytenmembran wurde mit sieben verschiedenen Enzymen ausgeführt. Nachfolgend ein kleiner Abriß über Eigenschaften und Substratspezifität der Enzyme:

1. α -Protease:

Das Enzym stammt aus dem Gift der Schlange *Crotalus atrox*. Die Spaltung von Peptidbindungen durch das Enzym erfolgt bei hydrophoben aliphatischen Aminosäureresten, wobei hauptsächlich am Aminoende von Leucin (94,95), aber auch Isoleucin, Valin und in geringem Maße bei Alanin die Spaltung erfolgt (96). Eine Hydrolyse kann nur bis zu einer Peptidgröße von fünf Aminosäuren erfolgen. Das Protein ist sehr gut geeignet zur Spaltung hydrophober Proteinanteile, wie sie besonders bei der Bande-3 als einem Transmembranprotein auftreten.

2. *Staphylococcus aureus* Protease:

Das Enzym (97) stammt aus *Staphylococcus aureus*, Stamm V 8, ist zwischen pH 3,5 - pH 9,5 aktiv, wobei maximale Aktivität zwischen pH 4,0 - 7,8 auftritt. Die Protease spaltet spezifisch Peptidbindungen am Carboxylende von Asparaginsäure und Glutaminsäure. Eine Ausnahme stellt die Bindung - Asparaginsäure - Cystein - dar, die nicht spaltbar ist.

3. Pronase P:

Das Enzym stammt aus *Streptomyces griseus* und bietet eine breite Substratspezifität (98). Die Hydrolyse eines Proteins erreicht 60-90% (99), wobei die proteolytische Aktivität von Pronase P sehr stark ist. Das Enzym spaltet solange Peptidbindungen auf, bis die Mehrheit der Aminosäuren des Proteins frei vorliegt. Sasakawa (100) fand ebenfalls einen sehr weiten Substratbereich, aber mit einer Spezifität auf der Hydrolyse von -R-Arginin- Bindungen.

4. Trypsin:

Trypsin ist eine Endopeptidase mit höchster Substratspezifität. Die Spaltung erfolgt an den Carboxylgruppen der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin (101). Der optimale pH-Bereich liegt bei pH 7-9. Die Spaltung der Peptidbindungen hängt allerdings sehr stark von der Natur der Seitenketten in der unmittelbaren Nachbarschaft ab. Die Nähe polarer Gruppen zur empfindlichen Peptidbindung setzt die Hydrolyserate deutlich herab (102,103).

5. Thermolysin:

Die Protease Thermolysin stammt aus *Bacillus Thermo- proteolyticus* Rokko. Sie spaltet hauptsächlich am Aminoende von hydrophoben Aminosäuren, z.B. Ileu, Leu, Val, Phe, Ala, Met, Tyr (104-106).

6. Papain:

Papain hydrolysiert die Amide von α - amino substituierten Aminosäuren wie Arg , Lys , Glu , His , Gly , Tyr . Die Amide von L-Arg und Lys sind am empfindlichsten für eine Spaltung (107,108). Die Katalyse ist dabei wiederum von der Ionisation der α - Carboxylgruppe abhängig. Bei pH 4 zeigt sich eine wesentlich schnellere Spaltung wie bei pH 7 (109). Bei längerer Hydrolysezeit spaltet Papain allerdings nicht nur die erwähnten Aminosäuren ab, sondern greift auch eine große Zahl anderer Peptidbindungen an (110).

7. Proteinase K:

Die Protease stammt aus Pilzen der Art *Tritirachium album* Limber. Das Enzym spaltet hauptsächlich Peptidbindungen an der Carboxylgruppe von aliphatischen und aromatischen Aminosäuren mit einer Bevorzugung von Alanin. Das Enzym zeigt eine sehr hohe Aktivität und führt zu einer intensiven Hydrolyse von Proteinen(111).

9.3 SDS - PAGE der enzymatischen Spaltprodukte von Band - 3 - Protein

Die SDS - PAGE wurde in Flachbettgelen (siehe S.72) in einer Elektrophoreseapparatur aus Plexiglas (112) mit folgendem Elektrodenpuffer durchgeführt:

192 mM	Glycin	6 g	Tris
25 mM	Tris	28,8 g	Glycin
0,1 %	SDS	2 g	SDS
ad 2,0 l H ₂ O bidest			

Hierbei wird zunächst die Glaskammer mit den beiden

linearen Gelgradienten in der Apparatur befestigt und der Elektrodenpuffer vollständig, d.h. bis über das Niveau der Gel-Taschen hinaus, eingefüllt. Anschließend kann die Probe in die jeweiligen Taschen mit einer feinen Pipette eingebracht werden.

Als Beladung einer einzelnen Kammer werden 5 - 7 μ l Probenvolumen aufgebracht, die somit ungefähr 8 - 10 μ g Protein umfassen. Die Proben sollten mindestens 20-25 % an Glycerin enthalten, um ein sauberes Auftragen auf die Geloberfläche in der kleinen Tasche zu gewährleisten. Dies wurde bereits durch Zugabe von Glycerin zur Inkubationslösung für die enzymatische Hydrolyse von B - 3 - Protein erreicht.

Die Elektrophorese wurde mit konstanter Leistung durchgeführt. Pro Kassette, die also zwei lineare Gelgradienten mit jeweils sechs Taschen enthielt, wurden zunächst für 10 Minuten 0,5 W (Stromstärke $I = 14$ mA), dann für 20 Minuten 1 W ($I = 21$ mA) und anschließend bis zum Ende der Elektrophorese 2 W ($I = 25$ mA) eingestellt. Unter diesen Bedingungen dauerte eine Elektrophorese ungefähr 110 - 120 Minuten. Durch einen Vorversuch wurde ermittelt, daß das Ende der Elektrophorese mit optimaler Auftrennung der Proteine im Gel dann erreicht war, wenn die Elektrophorese 25 Minuten nach Herauswandern der Pufferfront aus dem Gelunterrand abgeschaltet wurde. Die kleinsten Polypeptide waren dann bis fast an die Untergrenze des Geles gewandert und durch den Gelgradienten noch maximal voneinander getrennt worden.

9.4 Färbung des Gelgradienten

Nach vorsichtiger Herausnahme des Gels aus der Glaskammer wurde es zunächst für 90 Minuten in eine Fixierlösung gelegt.

Fixierlösung: 150 ml Methanol
+350 ml H₂O bidest
+17,25 g Sulfosalicylsäure
+57,5 g Trichloressigsäure

Anschließend wurde sechs Stunden bei Raumtemperatur gefärbt.

Färbelösung: 0,23 g Coomassieblau G 250
in 200 ml Entfärbelösung

Zur Entfärbung wurde die Entfärbelösung häufig gewechselt, bis das Gel vollständig von Coomassieblau befreit war (ungefähr 10 - 12 Stunden).

Entfärbelösung: 500 ml Äthanol
160 ml Essigsäure

ad 2,0 l H₂O bidest

Die Gele können dann für längere Zeit in Entfärbelösung aufbewahrt werden, wobei allerdings nach einigen Wochen die Farbhintensität der Proteinbanden abbläßt.

9.5 Auswertung der Versuche der partiellen enzymatischen Hydrolyse von Band-3-Protein in Flachbettgelen

Nachfolgende Abbildungen von Flachbettgelen geben einen Überblick über die Spaltprodukte der partiellen enzymatischen Hydrolyse von Band-3-Protein.

Auf das Flachbettgel wurden jeweils etwa 6 μ l Proben-
volumen, das etwa 8-10 μ g Protein enthielt aufge-
tragen (siehe S.64). Die Proben enthielten 25 %
Glycerin.

Als Referenzproben wurden Eichproteine und -peptide
verwendet. Sie dienen zur Molekulargewichtsbestimmung
der enzymatischen Spaltprodukte. In 5 μ l Proben-
lösung an Eichproteinen, die auf das Gel aufgetragen
wurden, waren 0,5 μ g Protein enthalten.

Die noch sichtbaren Einzelbanden der enzymatischen
Spaltprodukte enthalten etwa 0,05- 0,5 μ g Protein.

Die Elektrophoresedauer der Flachbettgele betrug
120 Minuten. Weitere Erläuterungen zu den Spaltungs-
und Elektrophoresebedingungen siehe S.58 und S.63

Als Eichproteine wurden verwendet:

Eichproteine E ₁ :	T - Trypsininhibitor	(MG 21500)
	C - Cytochrom C	(MG 12500)
	A - Aprotinin	(MG 6500)

Eichproteine E ₂ :	R - Rinderserumalbumin	(MG 67000)
	O - Ovalbumin	(MG 43000)
	T - Trypsininhibitor	(MG 21500)
	C - Cytochrom C	(MG 12500)
	A - Aprotinin	(MG 6500)
	I - Insulin B	(MG 3400)

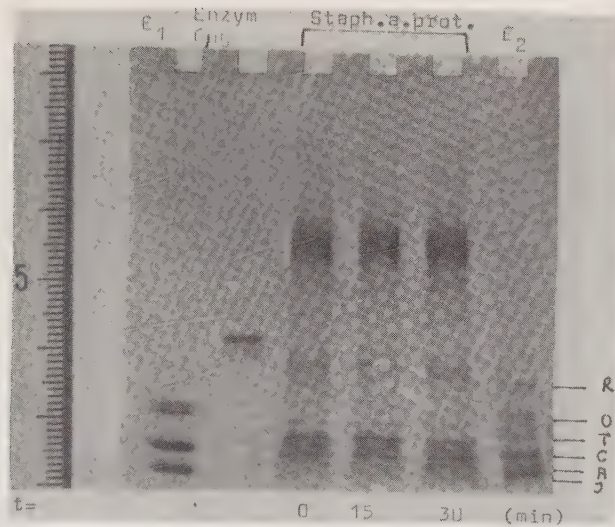


Abb.12: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Spaltprodukte der partiellen enzymatischen Hydrolyse von Band-3-Protein.

Enzym: Staphylokokkus-aureus-Protease

t bedeutet den Zeitpunkt der Probenentnahme aus dem Inkubationsansatz.

Bedingungen der Elektrophorese siehe S. 63

Erläuterungen zur Hydrolyse siehe S. 58

Eichproteine E₁ und E₂ siehe S. 66

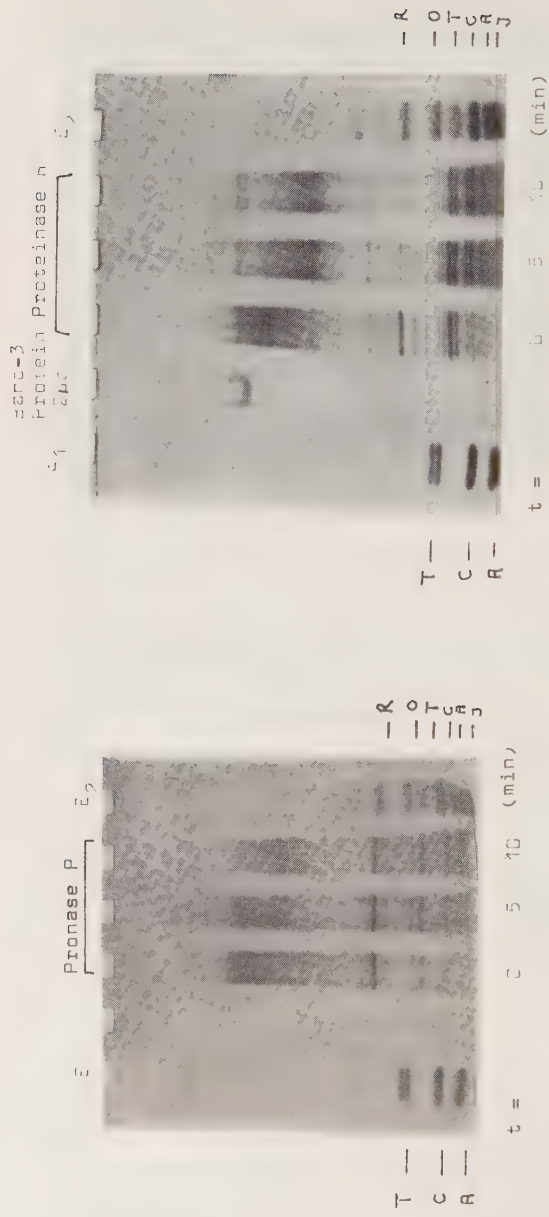


Abb.13: Enzym Pronase P

Abb.14: Enzym Proteinase K

Abb.13 und 14: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Spaltprodukte der partiellen enzymatischen Hydrolyse von Band-3-Protein.

t bedeutet den Zeitpunkt der Probenentnahme aus dem Inkubationsansatz.

Bedingungen der Elektrophorese siehe S.63

Erläuterungen zur Hydrolyse siehe S.58

Eichproteine E₁ und E₂ siehe S.66

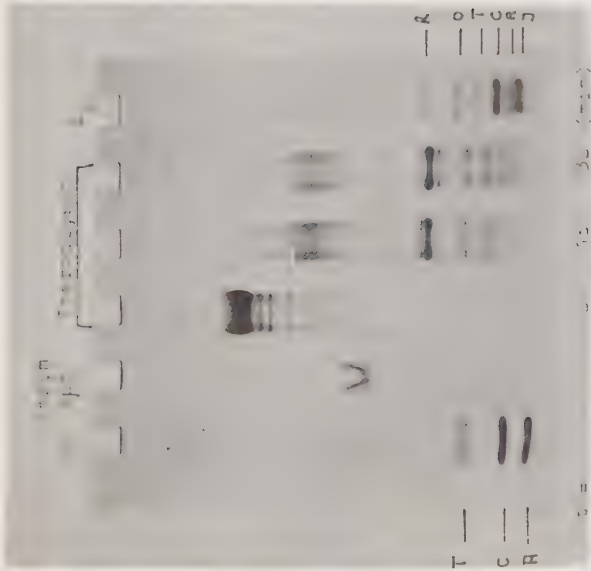


Abb.15: Enzym Thermolysin

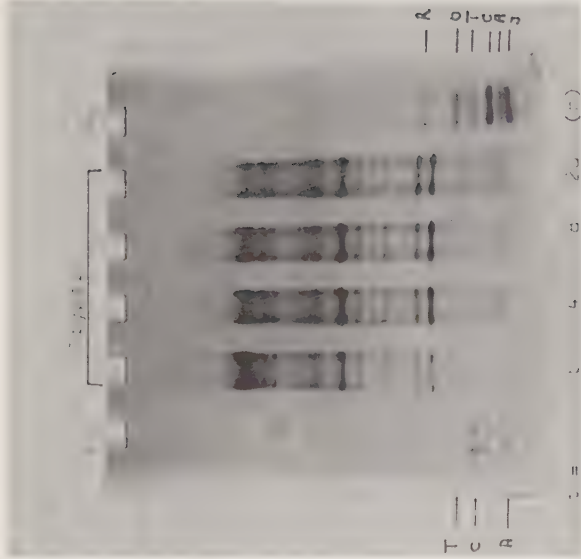


Abb.16: Enzym Trypsin

Abb.15 und 16: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Spaltprodukte der partiellen enzymatischen Hydrolyse von Band-3-Protein.
t bedeutet den Zeitpunkt der Probenentnahme aus dem Inkubationsansatz.
Bedingungen der Elektrophorese siehe S.63
Erläuterungen zur Hydrolyse siehe S.58
Eichproteine E₁ und E₂ siehe S.66

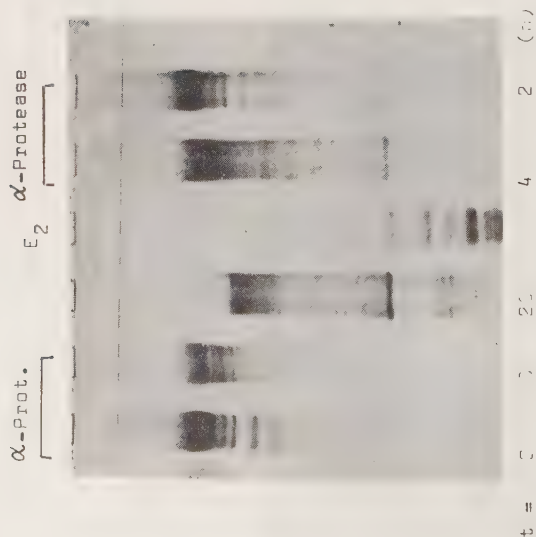


Abb. 17: Enzym α -Protease

Abb. 17 und 18: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Spaltprodukte der partiellen enzymatischen Hydrolyse von Band-3-Protein.
 t bedeutet den Zeitpunkt der Probenentnahme aus dem Inkubationsansatz.
 Bedingungen der Elektrophorese siehe S.63
 Erläuterungen zur Hydrolyse siehe S.58
 Eichproteine E_1 und E_2 siehe S.66

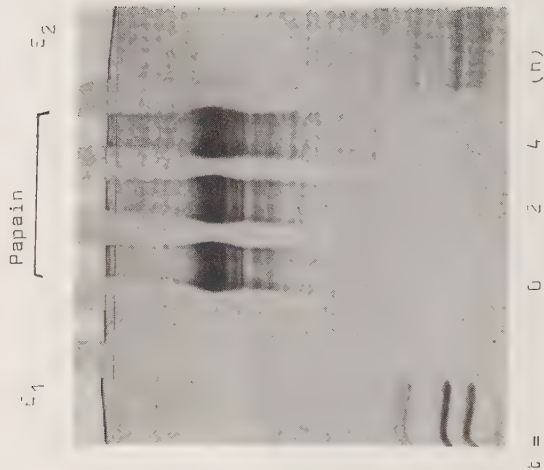


Abb.18: Enzym Papain

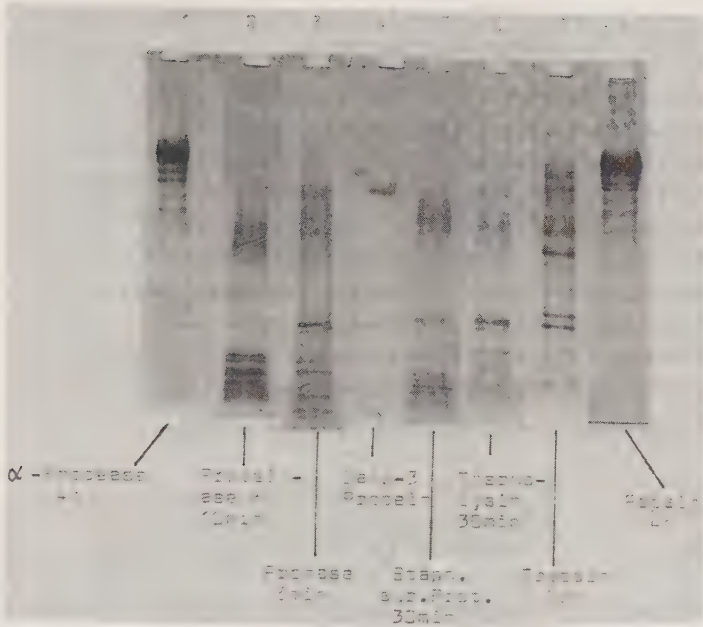


Abb.19: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Spaltprodukte der enzymatischen Hydrolyse von Band-3-Protein.

Vergleich der optimalen Spaltungsergebnisse der einzelnen Enzyme.

Bedingungen der Elektrophorese siehe S.63

Erläuterungen zur Hydrolyse siehe Tab.4.

Streifen 4: ungespaltene Kontrolle von Band-3-protein (etwa 3 μ g)

Streifen 1-3 und 5-6: auf das Gel wurden etwa 0-10 μ g Band-3-Protein aufgetragen

9.6 Herstellung der Flachbettgele zur SDS-PAGE der enzymatischen Spaltprodukte.

Die nach der partiellen enzymatischen Hydrolyse von Band-3-Protein entstandenen Spaltprodukte werden in einer SDS-PAGE in Flachbettkammern getrennt und mit Coomassieblau angefärbt. Die Vorbereitung der Glaskammern für die Gele, sowie der Prozeß des Gießens eines linearen Gelgradienten wurden nach der Methode von Anselstetter (112) durchgeführt. Für die Elektrophorese wurde ein linearer Gelgradient von 5,75 % - 21 % Acrylamid bzw. 1,75 % - 3 % Bisacrylamid verwendet.

Der Gelgradient hatte folgende Zusammensetzung:

$T = 5,75 / C = 1,75 \longrightarrow T = 21,0 / C = 3,0$

Persulfat: 2,2 mM

TEMED: 3,75mM $\rightarrow$ 1,6 mM

SDS: 5,25mM

Tris-Cl pH 8,9: 400 mM

Zum Gießen des linearen Gelgradienten wurden die folgenden Gellösungen verwendet:

A (T= 21/ C= 3)

5,2 ml 1 M Tris Cl pH 8,9

0,1 ml 20 % SDS

0,650ml 1 % Persulfat

2,65 g Acrylamid

0,082 g Bisacrylamid

ad 12,8 ml H₂O bidest

+ 240 µl TEMED

B (T= 5,75/ C= 1,75)

5,6 ml 1 M Tris-Cl pH 8,9

0,1 ml 20 % SDS

0,70 ml 1 % Persulfat

0,79 g Acrylamid

0,014g Bisacrylamid

ad 13,5 ml H₂O bidest

+ 610 µl 1 % TEMED

Nach dem Polymerisieren des mit Wasser überschichteten Gelgradienten, das innerhalb von 30 Minuten erfolgte, wurde auf das Gel eine Taschengellösung bis zum Oberrand der Kammer aufgebracht. Zur Bildung der Taschen wurde ein Plastikrechen mit sechs schmalen Zacken in die Gellösung eingeführt. Die Taschengellösung hatte folgende Zusammensetzung:

4,0 ml Tris - Cl pH 8,9
0,075 ml 20 % SDS
0,680 ml 1 % Persulfat
0,590 g Acrylamid
0,012 g Bisacrylamid

ad 9,5 ml H₂O bidest
+ 350 µl 1 % TEMED

Nach 6 - 8 Stunden wurden die Plexiglasrechen aus den Glaskammern vorsichtig herausgezogen. Die entstandenen Taschen dienten zur Aufnahme der Probenlösungen für die Elektrophorese.

10. Material und Methoden

10.1 Chemikalien und Geräte

Die verwendeten Substanzen wurden von folgenden Firmen bezogen:

Biorad:	Bisacrylamid, Acrylamid, TEMED
Boehringer:	Eichproteine
Mannheim	
Höchst:	Insulin
Pierce:	α -Protease
Serva:	SDS, Persulfat, Glycin,
	Trypsin, Papain, Pronase P,
	Fluorescamin

Staphylococcus aureus Protease war von G.Drapeau/ Montreal. Alle übrigen Enzyme und Chemikalien waren von der Firma Merck/Darmstadt in p.a. Qualität hergestellt.

Folgende Geräte wurden verwendet:

Elektrophorese:	ISCO Modell 492
Densitometer:	Kipp und Zonen DD 2
Ultrazentrifugen:	MSE 25 High Speed
	Spinco L 50
UV-Lampe:	Ultraviolett Products Inc.
	St. Gabriel USA
	mit einer Wellenlänge $\lambda = 350\text{nm}$
GradientengießBer:	Schlauchpumpe von Desaga
	LKB Varioperpex-Pumpe 2120

10.2 Präparation der Erythrocytenmembran

Die Präparation von hämoglobinfreien ghosts wird nach der Methode von Steck et al. (113), die auf Arbeiten von Dodge, Mitchell und Hanahan (114) beruht, ausgeführt. Die Präparation der Erythrocytenmembranen erfolgt nach vorheriger Reinigung mit isotoner Lösung und Abtrennung der Erythrocyten von den anderen Blutbestandteilen durch nachfolgende Hämolyse der Zellen in hypotoner Lösung. Durch Zentrifugation und mehrfache Waschungen können hämoglobinfreie ghosts, d.h. Zellhüllen der Erythrocyten gewonnen werden.

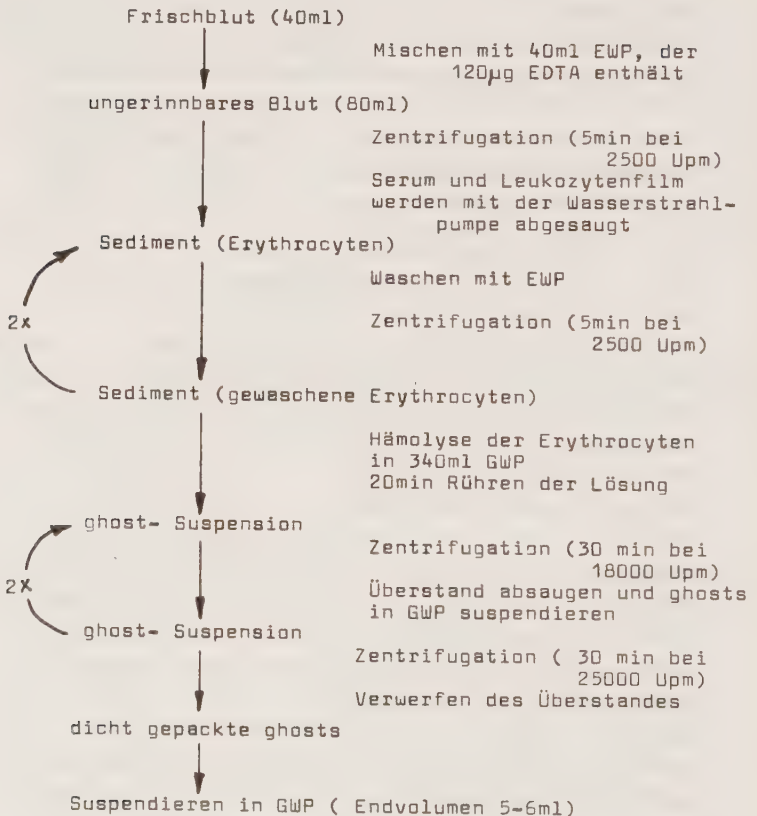
Alle Schritte der Präparation wurden bei $0 - 4^{\circ}\text{C}$ durchgeführt, um eine eventuelle Proteasewirkung zu vermindern (45,115-119)(siehe Schema S.76).

40 ml frisches Venenblut wird in eine Lösung von 120 mg EDTA in 40 ml EWP (Erythrocytenwaschpuffer) langsam eingespritzt und gut vermischt. Anschließend wird die Suspension in acht Zentrifugengläsern fünf Minuten bei 2500 Upm zentrifugiert.

Das Überstehende Serum wird ebenso wie der Leukocytenfilm mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und dann die Erythrocyten erneut in EWP suspendiert und wie oben angegeben gewaschen. Dieser Schritt wird insgesamt 3x wiederholt, wobei man besonders auf ein vollständiges Absaugen des Leukocytenfilmes Wert legen muß. Ein geringer Verlust an Erythrocyten läßt sich dabei nicht vermeiden. Die dichtgepackten Erythrocyten ($\sim 12-15$ ml) werden anschließend in hypotonem GWP (ghostwaschpuffer) hämolysiert. Hierbei wird die Erythrocytensuspension in dünnem Strahl unter Rühren in 340 ml GWP gegossen und 20 Minuten bei 4°C weitergerührt. Die Membransuspension wird in acht Zentrifugenbechern bei

Schema der Präparation von ghosts

Eisbad 0 - 4°C



Proteingehalt: 3-5 g/l

EWP: Erythrocytenwaschpuffer : 5mM Na-phosphat pH 8,0
150mM Na-Cl

GWP: Ghostwaschpuffer : 5mM Na-phosphat pH 8,0

18000 Upm 30 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes (Hämoglobin) wird das weißliche Sediment erneut in GWP suspendiert und zentrifugiert. Durch dreimaliges Waschen und Zentrifugieren lassen sich die ghosts schließlich reinigen. Der letzte Zentrifugierschritt erfolgt bei 25000 Upm für 30 Minuten. Das weißliche Sediment der ghosts wird in wenigen ml GWP suspendiert. Man erhält etwa 5 - 6 ml Erythrocytenmembransuspension, deren Proteingehalt 3 - 5 mg/ml beträgt.

10.3 Lösen der Membranen

Die durch Zentrifugation gewonnenen ghosts wurden wie folgt gelöst:

60 μ l ghostsuspension(enthält etwa 220 μ g
Protein)
+ 35 μ l dreifach konzentrierte Inkubations-
lösung
+ 10 μ l Glycerin (99 %)

Wasserbad 100° C für 5 Minuten
+ Bromphenolblau

Die Endkonzentration der Lösungsbestandteile ergibt sich wie folgt:

ghostsuspension in	
62,5 mM Tris - Cl pH 8,9	} Inkubationslösung
2 % SDS	
1 % β - Mercaptoäthanol	
2 % EDTA	
10 % Glycerin	

Das Inkubat wird dreifach konzentriert verwendet, um das Endvolumen möglichst gering zu halten.

β -Mercaptoäthanol wird zur Reduktion der Disulfidbrücken zwischen Membranproteinen zugesetzt.

Glycerinzugabe erfolgt, um die Lösung dichter zu machen, wodurch das Umschichten der Probenlösung (siehe dort) auf der Geloberfläche erleichtert wird. Die Glycerinkonzentration in der Probenlösung ist variabel, sollte aber 5 % nicht unterschreiten.

Zur Auflösung der ghosts wird das SDS-Gemisch 3-5 Minuten auf 100° C erhitzt.

Der Lösung wird als Marker für die Elektrophorese Bromphenolblau zugesetzt.

10.4 Messung der Ausbeute an elektrophoretisch eluiertem Protein

Eine bestimmte Menge an Protein (Albumin, Cytochrom C) sowie eine bekannte Protein-Menge an ghostsuspension (wovon 25-30 % Band-3-Protein ausmachen) wurden durch eine SDS-PAGE in verschiedenen Gelen getrennt, anschließend ausgeschnitten und aus den Gelstückchen elektrophoretisch eluiert.

Die Messungen der Ausbeute an Protein im Eluat im Verhältnis zur eingesetzten Menge erfolgen auf zwei verschiedene Arten.

1. Die Proteineluate wurden erneut einer SDS-PAGE unterworfen und dann mit Coomassieblau angefärbt. Als Referenzgele dienten coomassieblaufärbte Gele mit der ursprünglich aufgetragenen Proteinmenge. Mit Hilfe eines Densitometers (Kipp und Zonen) wurde die Coomassieblauintensität der Banden gemessen und mit den Referenzgelen (entspricht 100 %) verglichen.

Substanz	Elektrophorese- resedauer	Eluatvolumen	auf das Gel aufgetragene Proteinmenge	densitometrisch fundene Ausbeute *	mit Aminosäureanaly- sator gefun- denes Prot.	Ausbeute: mit Aminosäure- analysator bestimmt *
Albumin	90 min	120 µl	50 µg	95 %	43,5 µg	87 %
Insulin als Einzelkette	90 min	150 µl	100 µg	87 %	80 µg	80 %
Insulin als Doppelkette	90 min	150 µl	100 µg	89 %	85 µg	85 %
Cytochrom C	90 min	100 µl	50 µg	92 %	40,5 µg	81 %
Band-3- Protein	90 min	120 µl	40-50 µg **	80 %	38,7 µg	86 %

* Ausbeute in Prozent der Ausgangsmenge

** Etwa 25-30% der Gesamtmenge an aufgetragenen Protein der Erythrocytenmembran

Tabelle 5 : Messung der Ausbeute an elektrophoretisch eluiertem Protein mit Hilfe eines Aminosäureanalysators bzw. Densitometers

2. Der Proteingehalt im Eluat wurde direkt mit Hilfe eines Aminosäureanalysators gemessen(120) und mit der eingesetzten Proteinmenge korreliert.

Durch die beiden Meßverfahren (Tabelle 5) konnte für Albumin, Cytochrom C und Band-3-Protein die Ausbeute genau bestimmt werden. Für Band-3-Protein mußte die Ausgangsmenge an Protein rechnerisch ermittelt werden, während Albumin und Cytochrom C exakt eingewogen werden konnten.

10.5 Fluoreszenzfärbung der Proteine

Zur schnellen Lokalisation der Proteinbanden im Gel nach der SDS-PAGE wird eine Fluoreszenzmarkierung der gelösten Membranproteine durchgeführt. Als "label" dient dabei Fluorescamine, das mit primären Aminen stark fluoreszierende Verbindungen ergibt. Somit lassen sich Aminosäuren, Peptide und Proteine, sowie andere primäre Amine anfärben (121-127). Die Fluoreszenz bleibt über Stunden hinweg stabil und ist proportional der Aminkonzentration.

Zu der zu markierenden ghostsuspension (50µl ghost-suspension entspricht 170-180µg Protein) werden 50µl einer 0,4% Lösung von Fluram in Aceton zugegeben. Da die Reaktion von Fluorescamin mit den Proteinen innerhalb von Millisekunden erfolgt, ist darauf zu achten, daß während der Reaktionszeit eine optimale Durchmischung der Lösungen erfolgt (Vortex). Anschließend wird die dreifach-konzentrierte Inkubationslösung (siehe S.77) und Glycerin wie beim Lösen der Membranen zugegeben.

Der Ansatz wird in ein Wasserbad bei 50°C für 20 Minuten gestellt. Auf die Reihenfolge der Zugabe der Lösungen zur ghostsuspension ist zu achten, da

Fluorescamin auch mit Tris als einem primären Amin reagiert, und sich dadurch eine zu schwache Markierung der Proteine nur durch einen relativen Überschuß an Fluorescamin vermeiden ließe.

Der Inkubationsansatz hat also folgende Zusammensetzung:

50-60 μ l ghostsuspension (180-220 μ g Protein)
+ 50 μ l 0,4% Fluram in Aceton

gut mischen

+ 30 μ l dreifach- konz. Inkubationslösung (siehe S.77)
+ 15 μ l Glycerin (99%)

Mischen der Lösungen, Wasserbad von 50°C für 20 Minuten

Weitere Methoden zur schnellen Anfärbung von Proteinbanden in Gelen siehe (57, 128-131).

10.6 Färbemethoden

Die Proteinfärbung der Gele wird in Anlehnung an Weber und Osborn (42) mit Coomassie Brilliant Blue durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine ganz besonders scharfe Zonenbildung der Banden insbesondere des B-Bereiches bei einer Konzentration von 0,1% Coomassieblau; bei höherer Coomassieblau-Konzentration hingegen eine geringere Schärfe der Bandenfärbung.

Färbelösung:

0,1% Coomassieblau	0,1g Coomassieblau G-250
50 % Methanol	50ml Methanol
10 % Essigsäure	10ml Essigsäure

H₂O bidest ad 100ml

Die Färbung der Gele wurde über Nacht durchgeführt oder bei einer Mindestzeit von 6 Std bei Raumtemperatur. Die Gelstäbchen können dabei in großen Reagenzgläsern gefärbt werden. Die benutzte Färbelösung sollte dabei nur wenige Male verwendet werden, da beim Färbevorgang SDS aus den Gelen herausdiffundiert und dadurch die Färbelösung verunreinigt wird.

Die Färbung der Gele auf Glykoprotein wurde nach der Methode von Zacharius (132) und Fairbanks (7) durchgeführt. Die Gelstäbchen werden dabei wie nachfolgend gefärbt:

- 1) mindestens 10 h zur Fixierung des Proteins in Methanol-Wasser-Eisessig (5/5/1 Volumenanteile)
- 2) 3 Std in 7 % Essigsäure (Lösung 2 x wechseln)
- 3) 75 Minuten in 1 % Perjodsäure, gelöst in 3 % Essigsäure
- 4) häufiges Spülen mit Wasser bis eine Reaktion auf JO_3^- negativ ist.

5. Schiffssches Reagens nach Fairbanks; mindestens 8 h Inkubation
6. Eine Stunde spülen in einer frisch hergestellten Lösung von 0,5 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ in 0,1 N HCl; Lösung zweimal wechseln
7. Wiederholtes Spülen in Wasser bei 60°C bis nicht gebundene Farbe ausgewaschen ist
8. Aufbewahren der Gele in 7 % Essigsäure

Bei der Färbung von Phosphatgelen mit Schiffsschen Reagens kann Schritt 2 entfallen, nicht jedoch bei Gelen, die Tris enthalten, da durch Essigsäure Tris aus den Gelen entfernt wird, das bei keiner oder ungenügender Entfernung aus den Gelen mit Schiffsschen Reagens interferieren würde.

Nach einer Färbung auf Glykoproteine mit der Perjodat-Schiff-Methode ist eine nachfolgende Coomassieblau-Färbung auf Protein möglich.

Entfärbung

Bei der Entfärbung (36, 133) werden die Gelstäbchen in große Volumina Entfärbelösung eingebracht.

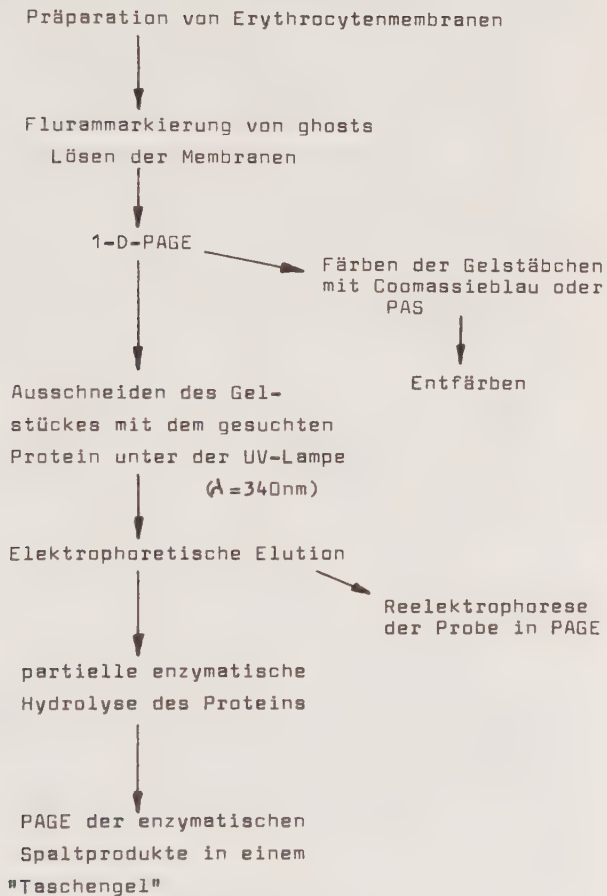
Die Entfärbelösung setzt sich wie folgt zusammen:

7,5 % Essigsäure	750 ml Essigsäure
5 % Methanol	500 ml Methanol
	ad 10,0 l H_2O bidest

Für die Fixierung der Proteine ist dabei das Methanol die entscheidende Substanz. Es beschleunigt das Aus-treten von SDS aus den Gelen, während Essigsäure für den Fixierprozess keine Bedeutung hat.

Die Entfärbelösung wird so oft gewechselt, bis sie farblos bleibt und die Gele ebenfalls durchscheinend sind. Der Entfärbevorgang läßt sich durch Erwärmen auf 60°C (Wärmeschränk) beschleunigen, wird aber besser lediglich bei Raumtemperatur durchgeführt, da in der Wärme möglicherweise Proteinbanden verschwinden können (Horstmann und Anselstetter unveröffentlicht.)

11. Schematische Übersicht über die Behandlung der ghosts



C. Diskussion

Die üblichen Techniken der Präparation von Proteinen, die wässrige Puffersysteme verwenden, haben sich als ungeeignet erwiesen, da sie nicht auf alle Membranproteine anwendbar sind. Durch Variation der Ionenstärke der wässrigen Lösungsmittel können nahezu alle peripheren Proteine gelöst werden (53, 59, 61, 62). Die meisten peripheren Proteine sowie ein kleiner Teil der membranintegrierten Proteine können mit organischen Lösungsmitteln oder Lösungsmittelgemischen gelöst werden (64-69, 70, 123).

Nichtionische Detergentien wie Triton-X-100 (73, 145-147), Tween (148) und andere (149) haben ebenfalls den Nachteil, daß sie nicht alle Lipid-Protein bzw. Protein-Protein-Wechselwirkungen aufheben. Lediglich Natriumdodecylsulfat (SDS) (150-154) als anionisches Detergens ist in der Lage alle Membranproteine und -lipide vollständig in Lösung zu halten.

Die Lösungseigenschaften des SDS ermöglichen eine Auflösung von Membranproteinen als Voraussetzung für eine gute Trennbarkeit in einer Gelelektrophorese. Dem Trennprinzip der SDS-PAGE liegt die Wanderung der negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe in einer Elektrophorese zu Grunde. Man kann durch die SDS-PAGE also eine Trennung eines komplexen Proteingemisches nach der Molekülgröße der einzelnen Komponenten erreichen.

Somit ist es möglich, für jedes Proteingemisch, insbesondere für die gelöste Erythrocytenmembran ein streng spezifisches Bandenmuster zu erzielen.

Um eine Brücke zwischen der reinen Beschreibung von Bandenmustern nach der SDS-PAGE und einer künftigen Erforschung der Chemie der einzelnen Membranproteine zu finden, wurde die elektrophoretische Elution von Proteinen in reiner Form aus einem Gel entwickelt.

Mit der hier ausgearbeiteten Methode liegt ein Verfahren der Isolation, Konzentration und Wiedergewinnung von Proteinen, die anfangs durch eine SDS-PAGE gereinigt wurden, vor. Die gesuchten Proteinbanden werden im Gel mit Hilfe der Fluorescamin-Färbung identifiziert und dann ausgeschnitten. Das gesuchte Protein kann dann ohne Vermischen mit anderen Proteinen, die durch die Vortrennung abgesondert wurden, selektiv aus den Gelstückchen elektrophoretisch eluiert werden.

Der Vorteil der elektrophoretischen Elution gegenüber anderen Methoden liegt darin, daß das Verfahren schnell und unkompliziert ist und dabei eine hohe Konzentration im Eluat erzielt werden kann. Gegenüber anderen Methoden der elektrophoretischen Elution besteht bei dem hier entwickelten Verfahren der Vorteil, daß die Elutionszeit mit 60 - 90 Minuten kurz ist (sonst meist 6 - 15 h) und daß das Eluatvolumen maximal 300 μ l beträgt und ohne Proteinverlust bis auf 100 μ l eingeengt werden kann. Eine nachfolgende Dialyse des Eluatvolumens oder eine Ausfällung des elektrophoretisch eluierten Proteins zur Konzentrationserhöhung entfällt bei der beschriebenen Methode.

Ein weiterer Vorteil gegenüber anderen bisher beschriebenen Elutionsverfahren für Proteine besteht in der konstant hohen Ausbeute, die sich bei den untersuchten Proteinen Albumin, Insulin, Cytochrom C und der Bande B der Erythrocytenmembran immer zwischen 85 - 95 % bewegte. Bei einer maximalen Beladung der Polyacrylamidgele mit Proteinlösung konnte eine Proteinkonzentration im Eluat von 2 - 4 μ g/ μ l erreicht werden.

Die Reinheit der gewonnenen Proben hängt von der Trennmethode im Gel vor der elektrophoretischen

Elution ab. Für Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten ist die SDS-PAGE die Methode der Wahl. Sie liefert streng getrennte Banden, die in der Regel nur ein Protein enthalten.

Bei den hydrophoben, integrierten Proteinen der Bande B der menschlichen Erythrocytenmembran erhebt sich das Problem der exakten Trennung in einer SDS-PAGE. Wegen nahezu gleicher Molekulargewichte zeigen Glykophorin und Band-3-Protein in der SDS-PAGE ähnliches Wanderungsverhalten. Eine Trennung der beiden Komponenten in einem Stäbchengel oder durch eine zweidimensionale SDS-PAGE ist zwar möglich, doch erlaubt sie kein völlig sauberes Ausschneiden einer Bande oder eines Proteinfleckes mit dem Skalpell aus dem Gel. Durch die Trennmethode der SDS-PAGE kann hier also nur ein annähernd reines Protein gewonnen werden, da geringe Verunreinigungen mit der anderen Komponente möglich sind. Dieser Nachteil könnte durch eine isoelektrische Fokussierung (155 - 157) beseitigt werden.

Nach der elektrophoretischen Elution kann das isolierte Protein weiter untersucht werden. Es bieten sich die Analyse der Aminosäurezusammensetzung des Proteins, die partielle enzymatische Hydrolyse oder eine Verwendung zur Herstellung von Antikörpern an, die für die Immunelektrophorese benötigt werden (158). Zur Untersuchung der Spaltprodukte der partiellen enzymatischen Hydrolyse eines schwer in größeren Mengen zu isolierenden Proteins eignet sich nach einer Isolierung durch die Methode der elektrophoretischen Elution eine SDS-PAGE in Flachbettgelen. Ein Volumen von 3 - 5 μ l Proteinlösung, das 5 - 10 μ g Protein enthalten sollte, genügt zur Auftragung auf das Gel. Eine Proteinmenge von 0,1 - 0,5 μ g pro Einzelbande ist ausreichend für eine Identifizierung

in der nachfolgenden Coomassieblaufärbung. Somit können auch Polypeptide bis zu einem Molekulargewicht von mindestens 3000 noch dargestellt werden.

Die hier beschriebene Methode einer elektrophoretischen Elution erlaubt es, Proteine und Polypeptide aus einem Gelstück, in dem sie vorher nach einer SDS-PAGE identifiziert wurden, zu gewinnen. Die isolierten Proteine liegen dabei in hoher Konzentration im Lösungsvolumen vor. Sie können dann zum Beispiel zur Aminosäureanalyse, enzymatischen Verdauung oder Immunelektrophorese verwendet werden.

Die entwickelte Methode der elektrophoretischen Elution von Proteinen aus einem Gel wurde an der Bande 8 der menschlichen Erythrocytenmembran erarbeitet. Es wurde aber stets darauf geachtet, daß das Prinzip eine Verwendung für Zytoplasmamembranen anderer Zellen oder für andere Proteine erlaubt.

D. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zur selektiven Isolierung von Proteinen aus einem Gemisch von Proteinen zu finden und die Proteine einzeln in Lösung zu erhalten. Untersuchungsobjekt waren die Proteine der menschlichen Erythrocytenmembran - hier besonders das Band-3-Protein -, Albumin, Insulin und Cytochrom C.

Da sich Versuche, die Bande 8 der Erythrocytenmembran mit Hilfe einer Anionenaustauschersäule rein darzustellen, als ungeeignet erwiesen, wurde als Trennverfahren für die Proteine die Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS) verwendet.

Hierzu werden alle Proteine der Erythrocytenmembran (ghost) durch das ionische Detergens SDS gelöst und die Proteine in einer Gelelektrophorese aufgrund unterschiedlicher Molekülgrößen zu einem reproduzierbaren Bandenmuster aufgetrennt.

Eine Methode der elektrophoretischen Elution von Proteinen aus einem Gelstück wurde entwickelt.

Durch Vorversuche konnte gezeigt werden, daß eine Elution von SDS-beladenen Proteinen aus einem Gel durch eine Elektrophorese und eine Gewinnung des Proteineluates praktisch durchführbar ist. Durch die Konstruktion eines Elutionsgerätes wurde die Gewinnung von Proteinen, die durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) voneinander getrennt waren, erreicht.

Hierbei wurden die Proteine, die sich in kleinen, aus einem Stäbchengel ausgeschnittenen Gelbrocken befanden, durch eine elektrophoretische Elution herausgelöst. Die Proteine sammelten sich in einer kleinen Kammer des Elutionsgerätes vor einer Dialysiermembran und konnten nach Beendigung der Elektrophorese in einem kleinen Lösungsvolumen (100-150 µl) gewonnen werden.

Durch Variation der Pufferzusammensetzung, der Stromstärke, Spannung, Zeitdauer für die Elution sowie der Eigenschaften der Dialysiermembran konnte eine maximale Ausbeute (80 - 90 %) an elektrophoretisch eluiertem Protein erreicht werden.

Eine reproduzierbare Methode zur elektrophoretischen Elution von Proteinen aus einem Gel wurde erarbeitet. In einer Anwendung der Methode wurden Albumin, Insulin und Cytochrom C elektrophoretisch eluiert und gezeigt, daß die Proteine in reiner Form und in hoher Konzentration aus einem Gel gewonnen werden konnten.

Bei der Bande B konnte, bedingt durch die Vortrennung der Proteine der menschlichen Erythrocytenmembran in einer SDS-PAGE, nur ein annähernd reines Protein gewonnen werden. Dieses besonders schwer zu isolierende integrierte Membranprotein wurde angereichert und dann durch Enzyme teilweise verdaut.

Die Spaltprodukte der partiellen enzymatischen Hydrolyse wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE in Flachbettgelen dargestellt und miteinander verglichen.

Der Entwicklung der elektrophoretischen Elution von Proteinen aus Gelen liegt ein Konzept zu Grunde, das die Gewinnung von Proteinen in hoher Ausbeute und hoher Konzentration im Lösungsvolumen ermöglicht. Bei einer geeigneten Trennung eines komplexen Proteingemisches, wie sie in den meisten Fällen durch die SDS-PAGE (eindimensional, zweidimensional) gegeben ist, aber auch nach isoelektrischer Fokussierung oder anderen Trennmethode für Proteine, kann durch die entwickelte Methode ein Protein in Lösung gewonnen werden und wird somit einer weiteren Untersuchung zugänglich.

E. Literaturverzeichnis

1. Rosenberg S.A., Guidotti G. in Jamieson G.A.
Greenwalt T. J. - Red Cell Membrane S.93
Lippincott, Philadelphia (1969)
2. Rouser G., Nelson G.J., Fleischer S., Simon G.
in Biological Membranes, Herausgeber: Chapman D.
Band 1, 5-69, Academic Press, London, New York (1968)
3. Ferber E., in Biological Membranes, Band 2, 221-252
Academic Press, London, New York (1973)
4. Gordon G.A., Wallach D.F.H., Stauss J.H.
Biochim. Biophys. Acta 183, 405-416 (1969)
5. Zwaal R.F.A., Roelfson B., Colley C.M.
Biochim. Biophys. Acta 300, 159-182 (1973)
6. Singer S.J., J. Colloid Interfac. Soc. 58, 452 (1977)
7. Fairbanks G., Steck T.L., Wallach D.F.H.
Biochem. 10, 2606-2617 (1971)
8. Anselstetter V., Horstmann H.J., Eur. J. Biochem. 56,
259-269 (1975)
9. Nicolson G.L., Marchesi V.T., Singer S.J.
J. Cell Biol. 51, 265-272 (1971)
10. Mitchell C.D., Hanahan D.J., Biochem. 5, 51-57 (1966)
11. Tilney L.G., Dehners P., J. Cell Biol. 66, 508 (1975)
12. Steck T.L., J. Cell Biol. 62, 1-19 (1974)
13. Marchesi V.T., Furthmayr H., Ann. Rev. Biochem. 45,
667-698 (1976)
14. Strapazon E., Steck T.L., Biochem. 16, 2966-2971 (1977)
15. Strapazon E., Steck T.L., Biochem. 15, 1421-1424 (1976)
16. Yu J., Steck T.L., J. Biol. Chem. 250, 9176-9184 (1975)
17. Klappauf E., Schubert D., FEBS Lett. 80, 423-425 (1977)

18. Cabantchick Z.J., Rothstein A.J.
J.Membr. Biol. 15, 207-226 (1974)
19. Ho M.K., Guidotti G., J.Biol.Chem. 250, 675-683 (1975)
20. Rothstein A., Cabantchick Z.J., Balshin M., Juliano R.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 64, 144-150 (1975)
21. Lin S., Spudich J.A., Biochem. Biophys. Res. Comm. 61,
1471-1475 (1974)
22. Kahlenberg A., J.Biol.Chem. 251, 1582-1590 (1976)
23. Brown P.A., Feinstein M.B., Sha'afi R.J.,
Nature 254, 523-525 (1975)
24. Bretscher M.S., Nature New Biol. 231, 229-232 (1971)
25. Segrest J.P., Kahane J., Jackson R.L., Marchesi V.T.
Arch. Biochem. Biophys. 155, 167-183 (1973)
26. Furthmayr H., Marchesi V.T., Biochem. 15
1137-1144 (1976)
27. Tomita M., Marchesi V.T., Proc. Nat. Acad. Sci. USA
Vol 72, 2964-2968 (1975)
28. Kahane J., Furthmayr H., Marchesi V.T.,
Biochim. Biophys. Acta 426, 464-476 (1976)
29. Sheetz M.P., Singer S.J.
J. Cell Biol. 73, 638 (1977)
30. Tanner M.P.J., Grey W.R., Biochem. J. 125, 1109-1117 (1971)
31. Carraway K.L., Shin B.C.,
J. Biol. Chem. 248, 1436-1444 (1972)
32. Kirkpatrick F.H., Grodesky St., Marinetti G.V.
Biochim. Biophys. Acta 345, 154-161 (1974)
33. Tanford C., The hydrophobic effect: formation of
micelles and biological membranes
John Wiley and sons, New York (1973)
34. Lenard J., Biochem. 9, 1129-1132 (1970)

35. Summers D. F., Maizel J. V. Jr., Darnell J.E.Jr.
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 54, 505-513 (1965)
36. Maizel J.V., in Fundamental Techniques in Virology,
Habel K. Salzman N.P. Ed. New York,
New York Academic Press 334 (1969)
37. Kiehn E.D., Holland J.J., Biochem 9, 1729-1738 (1970)
38. Berg H.C., Biochim.Biophys.Acta 183, 65-78 (1969)
39. Lenard J., Biochem.9, 5037-5040 (1970)
40. Hjerten S., Arch.Biochem.Biophys.Suppl.1, 147 (1962)
41. Laemli U.K., Nature 227, 680-685 (1970)
42. Weber K., Osborn M., J.Biol.Chem. 244, 4406-4412 (1969)
43. Neville D.M.Jr., J.Biol.Chem.,Vol 246, Nr.20,
6328-6334 (1971)
44. Jovin T.K., Dante M., Chrambach A.
Multiphasic puffer systems output,
Federal Scientific and Technical Information,
United States Department of Commerce, Springfield
Virginia (1971)
45. Lewis,K.J., Clark M.O., Analyt.Biochem. 6, 303-315
(1963)
46. Weliky N., Leaman D.H.Jr., Kahlmann J.,
Analyt. Biochem. 67, 507-514 (1975)
47. Koen A.L., Shaw C.R., Anal.Biochem. 9, 495-498 (1964)
48. Hjerten S., in Methodical Developments in Biochemistry
Vol.2 39-47 Longman, London (1973)
49. Jovin T.,Chrambach A., Naughton M.A.,
Anal. Biochem. 9, 351-369 (1964)
50. Hjerten S., Jerstedt S., Tiselius A.
Anal.Biochem.27, 108-129 (1969)
51. Gordon A.H., Louis L.N., Anal.Biochem. 21, 190-200
(1967)

52. Voytek P., Anal.Biochem 47, 629-640 (1972)
53. Shimada K., Sehkawa K., Fujinaga K., Yto Y.,
Anal.Biochem. 51, 456-465 (1973)
54. Roos P.,
Acta Endocrinol.Suppl (Copenhagen) 131, 1-93 (1968)
55. Davis B., Ann. N.Y. Acad.Sci 121, 404 (1964)
56. Ornstein L., Ann.N.Y. Acad.Sci. 121, 404 (1964)
57. Stephens R.E., Anal Biochem. 65, 369-379 (1975)
58. Sulitzeanu D., Slavin M., Yecheskeli E.,
Anal. Biochem. 21, 57-67 (1967)
59. Doly J., Petek F., J.of Chromat. 137, 69-81 (1977)
60. Karnaes P., Roos P.,
Anal.Biochem 77, 168-175 (1977)
61. Braatz J.A., McIntire K.R.,
Preparative Biochem. 7, 495-509 (1977)
62. Shin B.C., Carraway K.L.,
Biochim.Biophys.Acta 345, 141-153 (1974)
63. Braatz J.A., Mc Intire K.R.,
Preparative Biochem. 7, 6 (1977)
64. Fries E., Hjerten S.,
Anal.Biochem. 64, 466-476 (1975)
65. Hartmann B.K., Udenfried S.,
Anal.Biochem. 30, 391-394 (1969)
66. Feit H., Slusarek L. Shelanski M.L.,
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 68, 2028-2031 (1971)
67. Bryan J., Wilson L.,
Proc.Nat Acad.Sci. USA 68, 1762-1766 (1971)
68. Craig L.C., Pulley A.O., Biochem. 1, 89-94 (1962)
69. Craig C.L., Königsberg W.M.,
J.of Phys.Chem. 65, 166-172 (1961)
70. Tanner M.A., Boxer D.A., Biochem. J. 129, 333-347 (1972)

71. Fukuda M., Eskdat Y., Tarone G., Marchesi V.T.
J.Biol.Chem. 253, 2419-2428 (1978)
72. Findley J.B.C., J.Biol.Chem. 249, 4398-4403 (1974)
73. Yu J., Steck T.L., J.Biol.Chem. 250, 9170-9175 (1975)
74. Steck T.L., Dawson G., J.Biol.Chem. 249, 2135-2142 (1974)
75. Marchesi V.T., Furthmayr H., Tomita M.,
The red cell membrane 667-698 aus Annual Rev. of
Biochem. 45 (1976)
76. Bretscher M.S., J.Mol.Biol. 59, 351-357 (1971)
77. Jenkins R.E., Tanner M.J.A.,
Biochem.J. 161, 139-147 (1977)
78. Drickamer L.K., J.Biol.Chem. 252, 6909-6917 (1977)
79. Steck T.L. in Membrane Research, Ed: C.F. Fox
71-93, New York, New York Acad.Press (1972)
80. Mueller T.J., Morrison M.,
J.Biol.Chem. 249, 7568-7573 (1974)
81. Steck T.L., Ramos B., Strapazon E.,
Biochem. 15, 1154-1161 (1976)
82. Ho M.K., Guidotti G., J.Biol.Chem. 250, 675-689 (1975)
83. Cabantchick Z.J., Rothstein A.J.,
J.Mem.Biol. 15, 227-248 (1974)
84. Wolosin J.M., Ginsburg H., Cabantchick Z.J.,
J.Biol.Chem. 252, 2419-2427 (1977)
85. Ross A.H., Mc Connell H.M.,
Biophys.Res.Comm. 74, 1318-1325 (1977)
86. Nickson J.K., Jones M.N., Biochem.Soc.Trans. 5, 147 (1977)
87. Kahlenberg A., Zala C.A.,
J.Supramol.Structure 1, 149 (1977)
88. Hinkle P.C., Kasahara M.,
J.Supramol.Structure 1, 143 (1977)

89. Triche T.J., Tillach T.W., Kornfeld S.,
Biochim.Biophys.Acta 394, 540-545 (1975)
90. Adair W.L., Kornfeld S.,
J.Biol.Chem. 249, 4696-4704 (1974)
91. Tanner M.J.A., Jenkins R.E., Anstee D.J., Clamp J.R.,
Biochem.J. 155, 701-703 (1976)
92. Mueller Th.J., Morrison M.J.,
J.Biol.Chem. 252, 6573-6576 (1977)
93. Weber K., Unter D.J.,
J.Biol.Chem. 246, 4504-4509 (1971)
94. Pfleiderer G., Sumyk G.,
Biochim. Biophys. Acta 51, 482-493 (1961)
95. Pfleiderer G., Sumyk G.,
Anal.Biochem. 21, 219-226 (1967)
96. Pfleiderer G., Krauss A.,
Biochem. Z. 342, 85-94 (1965)
97. Drapeau G.R., Boily H., Homard J.,
J.Biol.Chem. 247, 6720-6726 (1972)
98. Tsugita A., Akabori S., J.Biochem.46, 695 (1959)
99. Nomoto M., Narahashi Y., Murahami M.,
J.Biochem 48, 593-602 (1960)
100. Sasakawa S., Satake K., J.Biochem.47, 672-677 (1960)
101. Keil B. in The Encymes III, 263-275 (1971)
102. Canfield R.E., J.Biol. Chem. 238, 2698 (1963)
103. Smith D.G., Stein W.H., Moore S.J.,
J.Biol.Chem. 237, 2845 (1962)
104. Matsubara H., Singer A., Sasaki R., Jukes T.H.,
Biophys.Res.Comm.21, 242-256 (1965)
105. Matsubara H., Smith E.L.,
J.Biol.Chem. 241, 2732 (1963)
106. Matsubara H., Feder J.
in The Encymes III, 721-795 (1971)

107. Glazer A.N., Smith E.L.
in *The Encymes III* 519-546 (1971)
108. Kimmel J.R., Smith E.L.,
Advanc. Encymol. 19, 267 (1957)
109. Drenth J., Jansonius J.N., Koekoek R., Swen H.M.,
Wolters B.G., *Nature* 218, 929 (1968)
110. Hill R.L., *Advanc. Protein Chem.* 20, 37 (1965)
111. Ebeling W., Hennrich N., Klockow M., Metz H.,
Orth H.D., Lang H., *Eur.J.Biochem.* 47, 91-97 (1974)
112. Anselstetter V., *J.Chromat.* 172, 49-56 (1979)
113. Steck T.L., Weinstein R.S., Strauss J.H.,
Wallach D.F.H., *Science* 168, 255-257 (1970)
114. Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J.,
Arch.Biochem.Biophys. 100, 119-130 (1963)
115. Koblyka D., Khettry A., Shin B.C., Carraway K.L.
Arch.Biochem.Biophys. 148, 475-487 (1972)
116. Bernacki R.J., Bosmann H.B.,
J.Mem.Biol. 7, 1-14 (1972)
117. Moore G.L., Kocholaty W.F., Cooper D.A., Grey J.L.
Robinson S.L., *Biochim.Biophys.Acta* 212, 126-133 (1970)
118. Steck T.L., Fairbanks G., Wallach D.F.H., in "Membrane Research"
Vol.5, 592 New York Acad.Press (1970)
119. Porter W.H., Preston J.L.,
Anal.Biochem. 66, 69-77 (1975)
120. Horstmann H.J., *Anal.Biochem.* 96, 130-138 (1979)
121. Weigele M., De Bernardo S.L., Teng J.P.,
Leimgruber W., *J.Am.Chem.Soc* 94, 5927-5928 (1972)
122. Udenfried S., Stein S., Boehlen P., Dairman W.,
Leimgruber W., Weigele M., *Science* 178, 871-872 (1972)
123. Weigele M., De Bernardo S.L., Leimgruber W.,
Biochem.Biophys.Res.Comm. 50, 352-356 (1973)
124. Cross J., Briggs W., *Biochem.Biophys.Acta* 471, 67-77 (1977)

125. Marchesi S.L., Steers E., Marchesi V.T.,
Tillack T.W., Biochem 9, 50-57 (1970)
126. Boehlen P., Stein S., Dairman W., Udenfried S.,
Arch.Biochem.Biophys. 155, 213-220 (1973)
127. Cross J.W., Briggs W.R.,
Biochim.Biophys.Acta 471, 67-77 (1977)
128. Takagi G., Kananobu K., Isemura T.,
Anal.Biochem. 79, 104-109 (1977)
129. Tsujii K., Takagi T., J.Biochem. 77, 117-123 (1975)
130. Wallace R.W., Yu P.H., Dieckert J.P., Dieckert J.W.,
Anal.Biochem. 61, 86-92 (1974)
131. Takagi T., Kubo K., Asakura J., Isemura T.,
J.Biochem. 78, 1297-1300 (1975)
132. Zacharius R.M., Zell T.E., Morrison J.H.,
Woodlock J.J., Anal.Biochem. 30, 148-152 (1969)
133. Laico M.T., Ruoslahti E.J., Papermaster D.S.,
Dreyer W.J., Proc.Nat.Acad.Sci. USA 67, 120-127 (1970)
134. Marchesi S.L., Steers E.Jr., Science 159, 203-204 (1968)
135. Harris J.R., Biochim.Biophys.Acta 188, 31-42 (1969)
136. Haggis G.H., Biochim.Biophys.Acta 193, 237-246 (1969)
137. Morawiecki A., Biochim.Biophys.Acta 83, 339-347 (1964)
138. Winzler R.J. in The red cell membrane, Structure and
Funktion , 157 (1969) Jamieson F.A., Greenwalt T.J.
Lippincott, Philadelphia
139. Blumenfeld O.O., Callopp P.M., Howe C., Lee L.T.,
Biochim.Biophys.Acta 211, 109-123 (1970)
140. Furthmayr H., Timpl R., Eur.J.Biochem. 15, 301-310 (1970)
141. Maddy A.H., Biochim.Biophys.Acta 117, 193-200 (1966)
142. Rega A.F., Weed R.J., Reed C.F., Berg C.G., Rothstein A.,
Biochim.Biophys.Acta 147, 297-312 (1967)

143. Zahler P.J., Wallach D.H.F.,
Biochim.Biophys.Acta 135, 371-374 (1967)
144. Zwaal R.F.A., van Deenen L.L.M.,
Biochim.Biophys.Acta 150, 323-325 (1968)
145. Demus H., Mehl E.,
Biochim.Biophys.Acta 211, 148-157 (1970)
146. Miller D.M.,
Biochem.Biophys.Res.Comm. 40, 716-722 (1970)
147. Yu J., Fishman A.D., Steck T.L.,
J.Supramol.Structure 1, 233-248 (1973)
148. Liljas L., Lundahl P., Hjerten S.,
Biochim.Biophys.Acta 426, 526-534 (1976)
149. Coleman R., Haldworth G., Fineau J.,
Biochim.Biophys.Acta 436, 38-44 (1976)
150. Juliano R.L.,
Biochim.Biophys.Acta 300, 341-378 (1973)
151. Trayer H.R., Nozaki N., Reynolds A., Tanford C.,
J.Biol.Chem. 246, 4485-4488 (1971)
152. Bormens M., Kasper C.B.,
J.Biol.Chem. 248, 571-579 (1973)
153. Rosenberg S.A., Guidotti G.,
J.Biol.Chem. 243, 1985-1992 (1968)
154. Rosenberg S.A., Guidotti G.,
J.Biol.Chem. 244, 5118-5124 (1968)
155. Righetti P.G., Drysdale J.W.,
Isoelectric Focussing, North Holland Elsevier
Amsterdam, New York (1976)
156. Stathakos D. in Righetti P.G.:
Progress in Isoelectric Focussing and Isotachophoresis
North Holland Elsevier, Amsterdam, New York, 65-75 (1975)
157. Kapadia G., Chrambach A., Rodbard D. in Allen R.C. and
Maurer H.R.: Electrophoresis and Isoelectric Focussing
in Polyacrylamide gels 115-144
de Gruyter, Berlin, New York (1974)

158. Bjerrum O.J.,
Biochim.Biophys.Acta 472, 135-195 (1977)
159. Rezinck A.Z., Alken H.J., Winzler R.J.
Anal.Biochem. 52, 395-401 (1973)
160. Tuszyński G.P., Damsky C.H., Fuhrer J.P.,
Anal.Biochem. 83, 119-127 (1977)

Lebenslauf

Ich wurde am 4.7.1954 als Sohn des Bundesbahnobersrates Albert Hofmann und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Krafft, in Nürnberg geboren.

Von 1960-1964 besuchte ich dort die Volksschule und trat 1964 in das mathematisch-naturwissenschaftliche Martin-Behaim-Gymnasium Über. 1973 legte ich dort das Abitur ab.

Mit dem Wintersemester 1973/74 begann ich das Studium der Medizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen. 1975 legte ich dort die Ärztliche Vorprüfung und 1979 das dritte Medizinische Staatsexamen ab.

Im Januar 1977 begann ich mit meiner Dissertationsarbeit im Physiologisch-Chemischen Institut bei Prof.Dr.H.-J.Horstmann.

1975 wurde ich in die Studienstiftung des Deutschen Volkes aufgenommen.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof.Dr.H.-J. Horstmann für die Überlassung des Themas, seine freundliche Unterstützung, seine anregenden Hinweise und hilfreichen Diskussionen.

Herrn Dr.V. Anselstetter danke ich ganz besonders für die Einarbeitung in die Methoden, seine wertvollen Diskussionen und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn M.Wirth für die Anfertigung des entwickelten Gerätes.

Herrn Prof.Dr.W.Kersten danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

